

REGIANE SZARGIKI

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Geral do Departamento de patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edilene Alcântara de Castro

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz-Soccol

CURITIBA  
2005

**À minha família, pelo incentivo, compreensão e paciência, em especial aos meus pais, pois seu amor e dedicação tornaram possível que eu trilhasse esse caminho.**

**À minha querida filha Amanda que é minha luz e minha força e a quem eu dedico todo meu amor.**

## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Edilene Alcântara de Castro e Professora Doutora Vanete Thomaz-Soccol, pela orientação, ensinamentos, críticas e sugestões.

À coordenação do curso de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, em particular a Dra. Vanete Thomaz-Soccol, por ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho.

Aos profissionais de saúde do Município de Prudentópolis que colheram e nos enviaram as amostras biológicas para exame.

Aos profissionais do Hospital de Clínicas que nos enviaram amostras biológicas para o diagnóstico da Leishmaniose tegumentar no laboratório de Parasitologia Molecular.

Ao Professor Doutor Enio Luz e Professora Doutora Ana Lozovei pelos valiosos ensinamentos e pelas palavras de incentivo.

Ao médico veterinário Doutor João Carlos Minozzo pelo auxílio e assessoramento em algumas fases do trabalho e pelo apoio e amizade em vários momentos.

À Direção Geral e Direção Técnica do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos pelo apoio e compreensão.

À bióloga (e amiga) Maria Inês de Pizzol Corrêa, pela amizade e incentivo.

À bioquímica Wilma Rosi Guerra por fornecer as amostras sorológicas de pacientes com Paracoccidioidomicose.

A todos os colegas do CPPI pela força e amizade.

A todo o pessoal do Laboratório de Parasitologia Molecular com os quais eu pude compartilhar de muitos bons momentos (em especial a Rosângela Paulino, Juliana e Luciane).

Aos colegas de Mestrado pela amizade.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho,

Meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRAT.....	VIII
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>05</b>
<b>2.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....</b>	<b>05</b>
<b>2.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.....</b>	<b>05</b>
<b>2.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....</b>	<b>05</b>
<b>2.4 CEPAS DE <i>Leishmania</i> UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENO.....</b>	<b>06</b>
<b>2.5 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS DE <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>06</b>
2.5.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA.....	06
2.5.2 CULTURAS PARA ESTUDO DE BIOMASSA.....	07
2.5.3 CONTAGEM DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> .....	07
<b>2.6 PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS.....</b>	<b>08</b>
2.6.1 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO BRUTO.....	08
2.6.2 PREPARO DO ANTÍGENO PARA A REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	08
2.6.3 PREPARO DO ANTÍGENO SOLÚVEL PARA O ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.....	08
<b>2.7 TÉCNICAS SOROLÓGICAS.....</b>	<b>09</b>
2.7.1 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Leishmania</i> POR REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	09
2.7.1.1 Realização da técnica de IFI.....	09
2.7.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.....	10
2.7.2.1 Padronização do Ensaio Imunoenzimático.....	10
2.7.2.2 Controle das placas.....	11
2.7.2.3 Nível de corte da reação Ensaio Imunoenzimático ("Cut-off").....	11
2.7.2.4 Realização da técnica de Ensaio Imunoenzimático.....	12
2.7.3 TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	12
2.7.3.1 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida.....	12
2.7.3.2 Transferência das proteínas.....	16
2.7.3.3 Imunodeteção.....	17
<b>2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>18</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>20</b>
3.3.1 EM MEIO NNN (Novy-MacNeal-Nicolle).....	20
3.3.2 EM MEIO CCS (Coração-Cérebro-Sangue).....	20
<b>3.4 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....</b>	<b>22</b>
3.4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI).....	22
3.4.2. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	22
3.4.3 ANÁLISE DOS SOROS PELAS TÉCNICAS DE IFI E ELISA.....	23
3.4.4 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS TÉCNICAS DE IFI E ELISA.....	24
3.4.5 CONCORDÂNCIA ENTRE AS TÉCNICAS IFI E ELISA.....	26
<b>3.5 TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOTTING</i>.....</b>	<b>27</b>
3.5.1 ANÁLISE DOS SOROS DE PACIENTES FRENTE AO ANTÍGENO DE <i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) <i>braziliensis</i> .....	27
3.5.2 ANÁLISE DOS SOROS DE PACIENTES FRENTE AO ANTÍGENO DE <i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>amazonensis</i> .....	30
<b>4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>53</b>

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> E <i>Leishmania braziliensis</i> EM MEIOS NNN E CCS.....	21
FIGURA 2	EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA PELA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS COM PADRÃO DE PESO MOLECULAR CONHECIDO.....	27
TABELA 1	SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO GEL DE SEPARAÇÃO A 15%.....	13
TABELA 2	SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO GEL DE EMPILHAMENTO A 5%.....	13
TABELA 3	PADRÃO DE PESO MOLECULAR (SDS-7) DE PROTEÍNAS UTILIZADAS NA ELETROFORESE E <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	14
TABELA 4	MATRIZ PARA CÁLCULO DOS INDICADORES PARA AS REAÇÕES SOROLÓGICAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.....	18
TABELA 5	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PELOS MÉTODOS IFI E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.....	24
TABELA 6	SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS TÉCNICAS DE IFI E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.....	25
TABELA 7	COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS IFI E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO CONTRA 60 SOROS DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	26
TABELA 8	PERCENTUAL DA PREVALÊNCIA DAS PROTEÍNAS RECONHECIDAS NA PESQUISA DE ANTICORPOS COM ANTÍGENO DE <i>Leishmania braziliensis</i> NO SORO DE PESSOAS DOENTES, COMUNICANTES E SADIOS PELA TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	29
TABELA 9	PROTEÍNAS RECONHECIDAS NA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Leishmania</i> COM ANTÍGENO DE <i>Leishmania braziliensis</i> NO SORO DE PESSOAS COM LEISHMANIOSE, E NO POOL DE SOROS DE PESSOAS COM OUTRAS PATOLOGIAS PELA TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	30
TABELA 10	PERCENTUAL DA PREVALÊNCIA DAS PROTEÍNAS RECONHECIDAS NA PESQUISA DE ANTICORPOS COM ANTÍGENO DE <i>Leishmania amazonensis</i> NO SORO DE PESSOAS DOENTES, COMUNICANTES E SADIOS PELA TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	32
TABELA 11	PROTEÍNAS RECONHECIDAS NA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Leishmania</i> COM ANTÍGENO DE <i>Leishmania amazonensis</i> NO SORO DE PESSOAS COM LEISHMANIOSE E NO POOL DE SOROS DE PESSOAS COM OUTRAS PATOLOGIAS PELA TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	33

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BSA	- Soro Albumina Bovina
CCS	- Coração-Cérebro-Sangue
CPPI	- Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
EDTA	- “ Ethylenediaminetetracetic Acid”
ELISA	- “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
FUNASA	- Fundação Nacional de Saúde
IFI	- Imunofluorescência Indireta
Kda	- Kilodalton
<i>L.a.</i>	- <i>Leishmania amazonensis</i>
<i>L.b.</i>	- <i>Leishmania braziliensis</i>
LPM	- Laboratório de Parasitologia Molecular
LTA	- Leishmaniose Tegumentar Americana
MHz	- Megahertz
mL	- mililitro
mm	- milímetro
NNN	- Novy-McNeal-Nicolle
OPD	- Ortophenilenediamina
PBS	- “Phosphate Buffer Solution”
PCM	- Paracoccidiodomicose
SDS	- “Sodiun Dodecyl Sulfate”
SESA	- Secretaria de Estado da Saúde
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
WHO	- “World Health Organization”

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana com 80 mil novos casos/ano no mundo é um dos grandes desafios epidemiológicos da Organização Mundial da Saúde. No Brasil as várias formas da doença (leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral) estão presentes e o diagnóstico precoce nem sempre é possível devido descentralização dos serviços de saúde, que recentemente sofreu municipalização carecendo de pessoal treinado para o mesmo. Outro aspecto que dificulta o diagnóstico precoce é o fato dos pacientes residirem em zona rural distantes dos serviços disponíveis. A busca por antígenos de fração específica e métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos, têm sido uma constante para muitos pesquisadores. No presente estudo a sensibilidade e a especificidade dos métodos parasitológicos e dos métodos sorológicos (Imunofluorescência indireta, Ensaio imunoenzimático e *Western blotting*) foram comparados para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Foram estudados cinco grupos clínicos: Grupo I: critério diagnóstico clínico; Grupo II: critério diagnóstico parasitológico; Grupo III: pessoas sem leishmaniose residentes em área de transmissão; Grupo IV: pessoas sem histórico para leishmaniose e residentes em área indene para a doença; Grupo V: pessoas com outras etiologias (Paracoccidioidomicose, Doença de Chagas e Toxoplasmose). Antígenos foram produzidos com as formas promastigotas de duas espécies causadoras de Leishmaniose tegumentar no Brasil: *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Os métodos parasitológicos individualmente confirmaram 70,1% do diagnóstico clínico de pacientes da área em estudo (61/87). Analisando amostras sorológicas do grupo II (N=60), 91,8 % foram reagentes na Imunofluorescência indireta para o antígeno de *Leishmania braziliensis* e 75,0 % com antígeno de *Leishmania amazonensis*. No Ensaio imunoenzimático quando usado antígeno de *Leishmania braziliensis* a sensibilidade foi de 95,0% e quando usado antígeno de *Leishmania amazonensis* obteve-se 71,7%. No *Western blotting*, 20 proteínas do antígeno de *L. braziliensis*, (de 16,6 a 218,8 Kda) foram reconhecidas pelo grupo II, contra 26 proteínas (de 23,9 a 173,3 Kda) do antígeno *L. amazonensis*. O antígeno de *L. braziliensis* mostrou-se mais sensível e revelou maior número de proteínas específicas para a doença. Duas proteínas de alto peso molecular (148,0 e 135,0 Kda) foram reveladas em soros de pacientes com Doença de Chagas com esse antígeno. O antígeno de *Leishmania amazonensis* mostrou baixa especificidade nas técnicas sorológicas, sendo que pelo menos seis proteínas de alto peso molecular (63 a 144,5 Kda) foram reveladas também por outros grupos clínicos (grupo III, IV e V). O presente estudo ressalta a importância da associação de dois ou mais métodos diagnósticos específicos e de fazer o diagnóstico diferencial. E, sobretudo demonstra que o uso de antígeno homólogo aumenta a sensibilidade do diagnóstico.

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis, with 80,000 cases/year worldwide, is one of the greatest epidemiological challenges faced by the World Health Organization. In Brazil, the disease is present in its many forms and the early diagnosis is not always possible since the patients don't have easy access to medical care. Many researches have been constantly working on more accurate and specific fraction antigens and diagnosis methods. In the current study the sensibility and particularity of the parasitologic and serologic methods (Indirect Immunofluorescence, Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA and Western blotting) were compared, in order to obtain the diagnosis for cutaneous leishmaniasis. Five groups of individuals were studied: Group I - clinical diagnostic. Group II - parasitology diagnostic. Group III - people without leishmaniasis residing in the transmission zone; Group IV - people without leishmaniasis history and dwelling in areas where the disease is not present; Group V - people with other etiological agents (Paracoccidioidomycosis, Chaga's disease and Toxoplasmosis). Antigens were developed with promastigote forms of the two species that caused cutaneous leishmaniasis in Brazil: *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The parasitologic methods confirm 70, 1% of the clinical diagnoses in patients within the study area (61/87). When analysing serologic samples from clinical group II (N=60), 91, 8% reacted to the Indirect Immunofluorescence. The sensitivity shown in the ELISA when using *Leishmania braziliensis* antigen was 95,0% and when using *Leishmania amazonensis* the sensitivity was 71,6%. When applying the Western blotting method, 20 proteins of the *L. braziliensis* antigens (from 16,6 to 218,8 Kda) were detected by the Group II against 26 proteins of the *L. amazonensis* antigens (from 23,9 to 173,3 Kda). The *L. braziliensis* antigen appeared to be more sensitive and revealed a greater number of specific proteins to the disease. The *Leishmania amazonensis* antigen has shown low specificity for the serologic techniques, being that at least six proteins of high molecular weight (63 - 144,5 Kda) were revealed also by other clinical groups (groups III, IV and V). The present study emphasizes the importance of the association of two or more specific diagnosis methods as well as doing the differential diagnosis. Above all, it demonstrates that the use of the homologue antigen increases the diagnosis sensibility.



## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são afecções causadas por protozoário digenético pertencente ao gênero *Leishmania* Ross, 1909. Este protozoário possui dois tipos de hospedeiros, um vertebrado que pode ser o homem, animais selvagens e domésticos e, o outro, um inseto vetor pertencente à Família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*. No Novo Mundo, os insetos capazes de transmitir o parasito pertencem aos gêneros *Lutzomyia*, França, 1924 e *Psychodopygus*, Mangabeira, 1941.

A leishmaniose pode apresentar-se clinicamente de duas formas: cutânea e a visceral. O aspecto clínico e a evolução da doença dependem da espécie do parasito em causa e da imunidade do hospedeiro. A forma cutânea conhecida no Novo Mundo como leishmaniose tegumentar americana (LTA), é causada por várias espécies de *Leishmania*.

O principal agente etiológico da LTA é *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 devido a sua ampla distribuição geográfica. Em pacientes imunocompetentes a forma simples da afecção começa com uma pápula indolor sobre as partes do corpo expostas a picada do inseto vetor, mais comumente membros inferiores, superiores e face. Esses nódulos evoluem para ulceração característica circular de fundo crostoso e bordos elevados e indurados. Após alguns meses, a cura pode ser espontânea deixando uma cicatriz no lugar. Porém, em 5% dos pacientes pode evoluir para forma mucosa. Esta forma da doença é grave, pois tem como resultado a deformação facial por mutilação e em alguns casos pode evoluir para morte. Começa com um edema pustuloso na boca e/ou narinas, podendo ulcerar-se mais tarde estendendo-se a mucosa nasofaríngea. Ocorre posteriormente a destruição da cartilagem nasal e do palato, em consequência da infecção secundária, vasculite e reações tissulares severas (BRYCESON, 1986). Em alguns casos a afecção pode atingir as regiões bronco-pulmonar e esofagiana, levando o indivíduo a um estado de caquexia.

A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, raramente afeta o homem. Pode também a doença evoluir sob a forma

cutânea com lesões únicas ou múltiplas e não curam espontaneamente. Em pacientes anérgicos evolui sob a forma difusa de extrema gravidade. As lesões nodulares não ulceram e são ricas em protozoários.

A espécie *Leishmania guyanensis*, Floch, 1954, caracteriza-se por causar lesões múltiplas que geralmente atingem o sistema linfático. A afecção responde mal ao tratamento e as recidivas são freqüentes.

A leishmaniose visceral, causada por *Leishmania infantum*, Nicolle, 1908 é extremamente grave por afetar órgãos importantes como fígado, baço, medula óssea e linfonodos. Quando não tratada a tempo, a doença é usualmente fatal (WHO, 1991).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é endêmica na América Latina estando presente em 21 países. No Brasil ocorre em 17 dos 27 estados da federação onde estão presentes as duas formas, tegumentar e visceral, que acometem pessoas de todas as faixas etárias e de ambos os sexos (LAISON & SHAW, 1987). A LTA tem mostrado uma tendência de expansão geográfica nos últimos anos. Em 1994, segundo a Fundação Nacional de Saúde, 1.861 municípios brasileiros registraram casos autóctones da doença. No ano de 2001 casos autóctones foram registrados em 2.268 municípios.

O maior número de casos de LTA ocorre na região Nordeste do Brasil, e a região Norte que até então apresentava baixos coeficientes, tem notificado vários surtos em áreas de desmatamento e colonização antiga (FUNASA, 2001). No Sul, o Paraná detém 98% dos casos, onde a LTA está presente em vários municípios (SILVEIRA et al., 1996; SILVEIRA et al., 1999; THOMAZ-SOCCOL et al., 2001; CASTRO, 2001; CASTRO et al., 2002; CASTRO et al., 2004). De acordo com registros da Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, em 2001 foram confirmados 247 casos dos 611 notificados até a 52<sup>a</sup>. semana epidemiológica. Em 2003, até a 45<sup>a</sup>. semana epidemiológica, dos 1028 casos suspeitos, foram confirmados 726.

O diagnóstico precoce da doença é uma das principais medidas preventivas, e com o aumento do número de casos clínicos da leishmaniose a cada ano no Brasil, é primordial que os métodos de diagnóstico sejam eficientes, de baixo custo e possam ser realizados nas áreas endêmicas (GUIMARÃES, 1987).

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em seres humanos pode ser clínico, parasitológico e/ou imunológico. O exame parasitológico de lesão deve ser sempre o método de escolha primário para confirmar o diagnóstico clínico, pois consiste no método de certeza. Entretanto, em estudos epidemiológicos que visam o controle em áreas endêmicas, as técnicas sorológicas são as mais adequadas, pois possibilitam a análise de maior número de pacientes.

Existem várias técnicas sorológicas utilizadas para detecção de anticorpos contra-*Leishmania* há muito citadas e comparadas na literatura, cada qual apresentando vantagens e desvantagens conforme o princípio de cada método (MENEZES et al., 1972; HOMMEL et al., 1978; EDRISSIAN & DARABIAN, 1979; MARZOCHI et al., 1980; DYE et al., 1993).

Contudo, a grande dificuldade, tanto no que se refere ao controle das várias formas da doença, quanto no diagnóstico preciso e tratamento adequado, está na grande diversidade antigênica das formas etiológicas. Estas diferenças moleculares e bioquímicas são hoje caracterizadas graças aos avanços da Biologia Molecular (RIOUX et al., 1990; ANDRADE et al., 1998; THOMAZ-SOCCOL et al., 2001; TURCO et al., 2001).

A proposta para isolamento de uma fração antigênica seja ela protéica ou polissacarídica vem sendo estudada há vários anos (FURTADO & PELLEGRINO, 1956; LA PLACA et al., 1975; MONROY-OSTRIA et al., 1997; ANDRADE et al., 1998; HOLZMULLER et al., 2002). Todavia, as pesquisas com identificação e isolamento de proteínas, têm sido direcionadas para a padronização de candidatos vacinais e pouco vem sendo aplicado ao diagnóstico em larga escala. E mesmo as vacinas patenteadas e existentes no mercado, não atingem boa sensibilidade ou proteção eficaz (MAYRINK et al., 1979; ILG et al., 1999; CARDOSO et al., 2003).

A despeito dos avanços em pesquisa, o método diagnóstico deve estar adequado a possibilidades e realidades da Rede de Saúde Pública. A escolha do método mais acessível e eficaz deve ser considerada, uma vez que dele depende a precocidade no início do tratamento do doente.

O presente trabalho tem por objetivo comparar três métodos sorológicos: imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático e *Western*

*blotting*, como auxiliares ao método parasitológico no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.

O uso destas metodologias justifica-se pelo fato de não serem invasivas, podem ser usadas em grande escala e melhorar a qualidade do diagnóstico desta doença. Embora o diagnóstico de certeza da LTA seja o parasitológico, este método pode ser limitado, pois à medida que a lesão evolui a probabilidade de encontro do parasito no local diminui. As culturas têm a desvantagem na contaminação bacteriana que normalmente acompanham a biopsia da lesão e na demora do desenvolvimento do protozoário.

Atualmente, o único método sorológico implantado nos laboratórios de imunodiagnóstico da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná como auxiliar no diagnóstico da leishmaniose é a reação de Imunofluorescência indireta (IFI). Porém, a característica do antígeno usado leva a uma reação grupo-específica. O ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando antígeno homólogo apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de ser um método prático, relativamente seguro e pouco oneroso, pois apresenta a vantagem de analisar várias amostras simultaneamente com rápida leitura. Quanto ao método de *Western blotting*, a grande vantagem está na alta especificidade podendo distinguir a LTA de outras patologias que normalmente compartilham da mesma área de transmissão. Este método ainda possibilita a identificação de proteína antigênica específica que, uma vez isolada, poderia ser avaliada para o desenvolvimento ou aperfeiçoamento de produto a ser usado para o diagnóstico rápido e seguro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. POPULAÇÃO ESTUDADA

A coleta de soros e biopsia de lesões foi realizada em pacientes do Município de Prudentópolis, onde os primeiros casos clínicos foram confirmados em 2002, e do Hospital de Clínicas da UFPR, provenientes de vários municípios do Estado do Paraná. As amostras foram coletadas entre os anos de 2002 e 2004.

### 2.2. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Os pacientes com diagnóstico clínico e portadores de lesões compatíveis com leishmaniose foram submetidos à aspiração ou biopsia do bordo da lesão. Também do bordo da lesão foi colhido material para exame direto por aposição corado com *May-Grunwald - Giemsa* e observado em Microscópio óptico a 1000X. O material de biopsia ou aspiração após assepsia era inoculado em meio de cultura (NNN, *Novy-McNeal-Nicolle* e *Tobbie & Evans*).

### 2.3. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Após a coleta de sangue, por punção venosa, as amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por duas horas e o soro separado foi centrifugado a 800 g por três minutos. As amostras de soro foram divididas em alíquotas em volumes de 300 µL, identificadas e armazenadas a -20°C. O conjunto de amostras foi dividido em cinco grupos:

- Grupo I: amostras sorológicas de pacientes cujo critério diagnóstico de leishmaniose tenha sido clínico;
- Grupo II: amostras sorológicas de pacientes com diagnóstico clínico comprovado por exame parasitológico (Grupo controle positivo);

- Grupo III: amostras sorológicas de indivíduos sem leishmaniose oriundos da área de transmissão;
- Grupo IV: amostras sorológicas de pessoas sem histórico para leishmaniose e residentes em área indene para a doença;
- Grupo V: amostras sorológicas de indivíduos com outras etiologias (Paracoccidioidomicose, Doença de Chagas e Toxoplasmose).

## **2.4. CEPAS DE *Leishmania* UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENO**

Os antígenos foram preparados a partir de formas promastigotas em cultura, das cepas de referência segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, MHOM/BR/78/PH8 e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, MHOM/BR/75/M2903. As cepas identificadas por isoenzimas, provinham do criobanco do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da UFPR.

## **2.5. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS DE *Leishmania***

Para avaliar a evolução morfológica e o rendimento das cepas de *Leishmania* na preparação do antígeno, foram usados comparativamente dois meios de cultivo bifásicos: NNN (*Novy-McNeal-Nicolle*) e CCS (Coração-Cérebro- Sangue) (Anexo 1).

### **2.5.1. OBTENÇÃO DA BIOMASSA**

As cepas descongeladas e reativadas eram mantidas em tubos com meio de *Tobbie & Evans* e repicadas a cada sete dias até obter biomassa para a preparação do antígeno. Foram preparados quatro frascos de *Erlenmeyer* contendo 25 mililitros do meio sólido de *Tobbie & Evans* (sendo dois frascos para cada cepa), em cada qual foi inoculado oito mililitros da fase líquida das culturas em manutenção e 12 mililitros de solução fisiológica a 0,85% estéril.

Após incubação a 24°C por sete dias, as culturas ampliadas serviram como inóculo para as culturas do estudo de biomassa.

### 2.5.2. CULTURAS PARA ESTUDO DE BIOMASSA

Para a quantificação da biomassa das espécies de *Leishmania* em questão, foram preparados para cada uma, nove frascos tipo *Erlenmeyer* contendo meio NNN e outros nove frascos com o meio CCS. Em cada frasco foi inoculado um mililitro da fase líquida da cultura de ampliação e nove mililitros de solução salina fisiológica a 0,85% esterilizada e incubado a 24°C.

O crescimento de cada cultura controle foi recolhido por centrifugação, após filtragem com gaze e solução fisiológica a 0,85%. Sucessivas lavagens (solução fisiológica 0,85%; 0,3%; 0,85% e PBS pH 7,2) e centrifugações com rotações crescentes (275, 350, 530 e 735 g) foram realizadas até a lise das hemácias e remoção da hemoglobina de coelho. O sedimento da última lavagem foi suspenso com solução PBS pH 7,2 com 2% de formol. Depois de verificada a imobilidade das formas promastigotas, foi realizado a contagem dos parasitos.

### 2.5.3. CONTAGEM DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania*

Após diluição a 1/10 da concentração, uma gota foi colocada entre lâmina e lamínula especial ultra plana numa Câmara de Thoma. A lâmina foi observada ao microscópio ótico com aumento de 400 vezes, e contadas as 16 fileiras maiores, calculando a média por fileira. Para a obtenção do número de parasitas por mililitro de antígeno, a média foi multiplicada pelas medidas da lâmina (250 mm X 103 mm) e pelo fator de diluição.

A curva da cinética de crescimento das cepas foi estabelecida a partir do segundo dia de incubação.

## 2.6. PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS

### 2.6.1. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO BRUTO

Os parâmetros para a produção dos antígenos foram definidos após análise da curva de crescimento de cada espécie de *Leishmania*.

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e de *Leishmania braziliensis* foram inoculadas em meio nutritivo CCS e cultivadas a 24°C por cinco dias. Após a fase exponencial, a fase líquida de cada cultivo foi recolhida e processada conforme descrito para o estudo da cinética de crescimento dos protozoários (item 2.5.2.). O sedimento final foi diluído em solução PBS pH 7,2.

### 2.6.2. PREPARO DO ANTÍGENO PARA A REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

O preparo dos antígenos seguiu os protocolos conforme Castro 2001, com adaptações (Anexo 2). Para inativação dos protozoários contidos na solução reconstituída e conservação do antígeno, o produto foi mergulhado em banho-maria a 55°C por oito minutos (adaptação baseada em Pessoa, 1988).

Procedeu-se em seguida a contagem das formas promastigotas (como descrito no item 2.5.3.), para o cálculo da diluição final do produto. Uma vez estabelecida a diluição ótima do antígeno, o mesmo foi dividido em alíquotas e armazenado a 4°C.

### 2.6.3. PREPARO DO ANTÍGENO SOLÚVEL PARA O ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Para a extração de antígenos solúveis, doze estoques de concentrados de antígeno bruto foram produzidos de cada espécie de *Leishmania* (protocolo no Anexo 3).

Após a última centrifugação, os sedimentos de *Leishmania braziliensis* e de *Leishmania amazonensis* foram armazenados em freezer a -20°C, até a utilização, quando então eram descongelados e centrifugados a



800 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi diluído em água destilada esterilizada num volume igual à metade do volume desse sedimento. As células em suspensão foram submetidas à criorruptura por choque térmico (-196°C e 37°C por cinco minutos alternados) e as partículas resultantes foram submetidas ao ultra-som por seis aplicações a 30 watts. A solução com o extrato bruto foi centrifugada por 60 minutos a 14.000 g e 4°C. O sobrenadante foi recuperado e filtrado em sistema de filtração esterilizante. Após a dosagem de proteínas pelo Método de Bradford (Anexo 4), o antígeno foi distribuído em alíquotas de pequenos volumes e acondicionados a - 20°C.

## 2.7. TÉCNICAS SOROLÓGICAS

### 2.7.1. PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* PELA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI), SEGUNDO CHIARI, 1973.

O princípio da técnica de Imunofluorescência indireta (IFI) é uma reação antígeno-anticorpo, visualizada pela adição de um anti-anticorpo (conjugado) acoplado à fluoresceína. Esta absorve luz azul (comprimento de onda de 490nm) e emite uma intensa fluorescência amarelo-esverdeada. A reação será tanto mais intensa quanto maior a quantidade de anticorpos específicos no soro avaliado.

#### 2.7.1.1. REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IFI

O teste foi realizado utilizando-se lâminas de vidro marcadas, previamente tratadas e sensibilizadas com o antígeno, conforme protocolo no anexo 5.

A triagem das amostras foi feita com as diluições de 1:20 e 1:40. Os soros testes que apresentaram reação na maior diluição foram utilizados em diluição seriada até 1:640 para a titulação. Cada série de soros foi acompanhada de um controle negativo e um controle positivo.

O conjugado utilizado no presente trabalho foi o anti-Imunoglobulina

G humano marcado com fluoresceína, padronizado pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Bio-Manguinhos). Conforme padronização prévia o conjugado foi utilizado na diluição de 1:150 em solução Azul de Evans.

A leitura do teste foi realizada em microscópio para imunofluorescência fotomicroscópio (lâmpada HBO 200 e filtro BG 12) em aumento de 400x.

#### 2.7.2. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA), SEGUNDO *ENGVAL* & *PERLAMANN*, 1972.

O método é baseado na leitura do espectro de cor resultante da reação antígeno-anticorpo e conjugado com peroxidase. A gradação de cores gerada pela reação da peroxidase varia de amarelo pálido a amarelo intenso ou laranja. Assim sendo, quanto mais alto o nível de anticorpos presentes na amostra sorológica, mais intensa será a cor.

Foi realizada pesquisa de anticorpos por ensaio imunoenzimático em amostras de soro humano contra antígenos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*.

##### 2.7.2.1. Padronização do Ensaio imunoenzimático

Na padronização do ensaio imunoenzimático foram utilizadas placas esterilizadas de 96 cavidades, marca CORNIG. Foi empregado conjugado anti-imunoglobulina G humano com peroxidase, marca Sigma, código A-170 e o cromógeno OPD (*ortho-phenylenediamine dihydrochloride*) marca Sigma a 0,38 mg/mL de tampão citrato. O substrato para cromógeno foi o peróxido de hidrogênio a 30% (4µL para 10,5 mL de tampão citrato) (ver anexo 7).

Numa mesma placa, constituída por 96 pocinhos (distribuídos em 12 colunas e oito linhas), foram analisadas duas concentrações dos antígenos (500 e 1000 ng/pocinho), frente a três diluições (1:25, 1:50 e 1:100) de duas amostras de soros-controle positivos e um controle negativo e duas diluições do conjugado (1:500 e 1:1000). A coluna um não recebeu soro, antígeno ou conjugado. A coluna 12 não recebeu antígenos.

Foram considerados os títulos, cujos valores de absorvância, reuniam as diluições do conjugado e concentração dos antígenos capazes de melhor discriminar entre controles positivos e negativos.

#### 2.7.2.2. Controle das placas

Em todos os testes foram utilizados soros controles positivo e negativo (com e sem antígeno, última coluna da placa). A eficácia do bloqueio de placa era verificada deixando-se a primeira coluna da placa sem adição de antígeno, soro ou conjugado. Foi analisado soro controle positivo com e sem conjugado para avaliar a reatividade deste.

Os soros testes eram sempre colocados em duplicata e as médias entre as densidades ópticas, calculadas em seguida.

#### 2.7.2.3. Nível de corte da reação do Ensaio imunoenzimático (*Cut-off*)

Para estabelecer o nível de corte do teste, 11 amostras de soros humanos provenientes de zona indene para Leishmaniose no Estado do Paraná, foram analisadas contra os antígenos *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*. Com a leitura das densidades ópticas foram realizados os cálculos (segundo a equação a seguir, conforme SPIEGEL, 1976, p.111) para que fosse estabelecido o nível de corte (*cut-off*) e sensibilidade do teste.

$$S = \sqrt{\sum[(\omega_2 - \omega)^2]/n}$$

s = desvio padrão da amostra

$\sum$  = somatória

$\omega_2$  = densidade óptica de cada amostra

$\omega$  = média das densidades

n = número de amostras

Foram respeitadas as mesmas condições estabelecidas na padronização do teste.

#### 2.7.2.4. Realização da técnica de Ensaio imunoenzimático

As soluções utilizadas para o ensaio imunoenzimático e o protocolo de execução da técnica estão descritos nos anexos 6 e 7.

#### 2.7.3. Técnica de *Western blotting*, segundo *Towbin et al.*, 1979.

A técnica de *Western blotting* é bastante usada para identificação e quantificação de proteínas específicas em misturas complexas como os antígenos. Na imunodeteção, biomoléculas separadas eletroforicamente são transferidas do gel de SDS-poliacrilamida para um suporte inerte (membrana de nitrocelulose). Em seguida são avaliadas com anticorpos que reagem especificamente com os epítopos antigênicos presentes na proteína alvo ligada ao suporte.

No presente trabalho, a técnica de *Western blotting* foi adotada segundo *Towbin et al.*, 1979, porém com modificações quanto à escolha dos corantes, períodos de incubação de soro e conjugado (anexos 9 e 10).

##### 2.7.3.1. Eletroforese de proteínas em gel de poli(acrilamida)

O método de eletroforese é baseado no deslocamento de biomoléculas de qualquer carga elétrica através da aplicação de um campo elétrico numa matriz que normalmente é um gel. A velocidade de migração da partícula depende do seu número de carga, do seu peso molecular e da intensidade do campo aplicada. Quanto maior a razão entre a carga e a massa da partícula, mais rápida será sua migração. As condições físico-químicas do meio são mantidas em função do sistema tampão utilizado.

### 2.7.3.1.1. Procedimentos da eletroforese

O preparo das soluções para utilização na eletroforese está detalhado no anexo 8, enquanto que o protocolo de execução da técnica de eletroforese está descrito no anexo 9.

- Montagem do molde de gel

A malha do gel é escolhida dependendo do perfil da proteína. O tamanho dos poros varia com a concentração de acrilamida utilizada na polimerização. A proporção de bisacrilamida é mantida constante e faz-se variar a acrilamida entre cinco e 20%, dependendo do tamanho dos poros que se deseja para separar moléculas menores ou maiores. Para o presente trabalho foi escolhido gel de separação a 15% (Tabela 1) e a espessura da malha foi de um milímetro. O gel de empilhamento teve concentração fixa de 5% (Tabela 2).

**TABELA 1 - SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO GEL DE SEPARAÇÃO A 15%.**

COMPONENTES	VOLUME (ml)
H <sub>2</sub> O	4,6
Acrilamida 30%	10,0
TRIS 1,5M (pH8,8)	5,0
SDS 10%	0,2
Persulfato de amônio 10%	0,2
TEMED	0,016

**TABELA 2 - SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO GEL DE EMPILHAMENTO A 5%.**

COMPONENTES	VOLUME (ml)
H <sub>2</sub> O	4,1
Acrilamida 30%	1,0
TRIS 1,0M (pH6,8)	0,75
SDS 10%	0,06
Persulfato de amônio 10%	0,06
TEMED	0,012

- Preparo das amostras:

Amostras dos antígenos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram diluídas em igual volume de tampão de amostra (Tris pH 6,8, SDS 10%, Glicerol, EDTA 0,1M, Azul de Bromofenol). As amostras foram tratadas com agente redutor (2-mercaptoetanol) e desnaturadas por calor (100°C).

- Preparo dos padrões:

Foi utilizado padrão de peso molecular de proteínas SDS-7 para a corrida eletroforética e *Western blotting* (Tabela 3).

**TABELA 3** - PADRÕES DE PESO MOLECULAR (SDS-7) DE PROTEÍNAS UTILIZADAS NA ELETROFORESE E *WESTERN BLOTTING*

COMPONENTE	ORIGEM	PESO MOLECULAR(Da)
Albumina	bovina	66,000
Ovoalbumina	galinha	45,000
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	coelho	36,000
Anidrase carbônica	bovina	29,000
Tripsinogênio (PMSF tratado)	bovina	24,000
Inibidor de tripsina	soja	20,100
Alfa-lactoalbumina	bovina	14,200

As proteínas marcadoras (padrões) foram tratadas de modo idêntico às amostras, conforme orientação do laboratório fabricante. O padrão pode ser armazenado em freezer e não é necessário ferver novamente quando da reutilização (a não ser quando diluído novamente).

O padrão de peso molecular de proteínas foi utilizado para estabelecer a função da reta correlacionando logaritmo de peso molecular das biomoléculas e a sua migração eletroforética.

- Aplicação das amostras e padrão

Para a padronização foi escolhido pente de Teflon com 15 dentes, com cinco mm de largura, um mm de espessura e 10 mm de profundidade. O volume máximo da amostra a ser aplicado foi calculado através da profundidade do poço X largura do pente X espessura do gel, resultando em 50  $\mu$ l. Após a padronização, foi utilizado pente contínuo para aplicação de amostra única, na concentração ótima determinada observada na coloração do gel. Foi usado o mesmo volume em todos os poços. O volume aplicado dependeu da concentração protéica do antígeno a ser analisado e do número de proteínas existentes na solução antigênica.

- Migração

As cubas do tanque do sistema foram preenchidas com tampão de corrida pH 8,3 até os eletrodos estarem totalmente cobertos. Conectados os eletrodos à fonte e aplicada amperagem constante (30 mA), deu-se início a corrida eletroforética até que o corante indicador (azul de bromofenol) fosse observado como uma linha ao fundo do gel.

- Revelação

Após a corrida eletroforética, o sistema de placas foi desmontado, o gel removido delicadamente e mergulhado em solução corante Coomassie Brilhante por 30 minutos (ou procedida transferência). O gel foi então retirado dessa solução e mergulhado em solução descorante por 12 horas até a completa revelação das proteínas (a solução foi renovada quando percebida a saturação). O gel assim corado foi armazenado com uma solução esterilizada de glicerol a 20% em água destilada e selado em plástico resistente.

- Interpretação do perfil eletroforético

As “bandas” de proteínas formadas no gel foram analisadas conforme a sua mobilidade eletroforética, utilizando como parâmetro, um padrão de massa molecular conhecido, corrido pareado às amostras. A mobilidade eletroforética ( $R_f$ ) é a razão entre a distância percorrida pela

proteína no gel e a distância total da corrida (tamanho do gel) e é inversamente proporcional ao logaritmo de massa molecular.

Para a determinação do peso molecular de uma amostra é construída uma curva de calibração, com o logaritmo do peso molecular das proteínas do padrão na ordenada e a mobilidade eletroforética das mesmas na abscissa. A partir de uma reta traçada é determinada uma equação (programa Excel) de ajuste para o cálculo de peso molecular das proteínas analisadas, pelo antilogaritmo do resultado da equação.

### 2.7.3.2. Transferência das proteínas

Pouco antes do final da corrida eletroforética, eram preparados os aparatos para a transferência das proteínas resolvidas no gel:

- Corte das duas folhas de papel filtro Whatmann nº 3 (espessura três mm), com largura e comprimento pouco maiores que as medidas do gel;
- Corte da membrana de nitrocelulose suporte (Hybond ECL – código rpn 303D/ Amersham);
- A membrana e as folhas de papel filtro eram colocadas em imersão em cuba contendo tampão de transferência, juntamente com as esponjas e as placas perfuradas;
- Desmontagem do sistema de eletroforese com a retirada cuidadosa da placa de vidro sobre o gel;
- Marcada a orientação de corrida no gel, lavagem do mesmo com tampão de transferência;
- Montagem do sistema de transferência:
  - Sobre o gel, era colocada uma das folhas de papel filtro umedecida e passava-se sobre este, um bastão de vidro para retirada das bolhas.
  - Sobre a placa do sistema de transferência com indicação de polaridade negativa era colocada uma das esponjas e sobre a esponja, o papel filtro com o gel voltado para cima;
  - Sobre o gel, era colocada a membrana de nitrocelulose e passado novamente sobre este, o bastão de vidro para remoção das bolhas;



- Sobre a membrana, era colocada a segunda folha de papel filtro umedecida;
- Hidratava-se novamente com tampão de transferência e passava-se o bastão de vidro mais uma vez;
- Colocava-se a outra esponja e sobre esta, a outra placa de transferência (pólo positivo).
- Fechava-se o sistema montando o “sanduíche” que foi encaixado na cuba preenchida com tampão de transferência;

A cuba foi colocada em geladeira e, conectados os eletrodos (negativo-negativo positivo-positivo). O aparelho foi programado para transferência de proteínas em voltagem constante a 24 volts e amperagem variável, por 14 horas. Em seguida, a voltagem foi alterada para 48 volts por 60 minutos.

Ao final da transferência, o aparelho foi desligado e o sistema desmontado. A membrana foi marcada na orientação da corrida e mergulhada em solução corante Ponceau'S por 30 minutos com agitação leve.

Para remoção do corante em excesso, a membrana foi lavada com água destilada até as “bandas” de proteínas estarem nítidas. Após secagem em temperatura ambiente, a membrana foi cortada em tiras (blots) no sentido da corrida eletroforética.

#### 2.7.3.3. Imunodeteccção

A partir do momento que a proteína encontra-se adsorvida na membrana, a imunodeteccção pode ser visualizada e executada como um ensaio de imunoadsorção enzimática.

Do mesmo modo como foi feito para o ensaio imunoenzimático, a padronização da imunodeteccção por *Western blotting*, foi realizada com diluições diferentes de soro (1/50, 1/75 e 1/100). O conjugado foi mantido em diluição fixa de 1:1000, como a diluição usada para o ensaio imunoenzimático. Como cromógeno e substrato foram utilizados aminoetilcarbazole + peróxido de hidrogênio. O preparo das soluções e procedimento da técnica de *Western blotting* está no anexo 10.

## 2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo dos índices que atestam a validade dos resultados obtidos por sorologia, o diagnóstico de positividade foi estabelecido por comparação com o diagnóstico de certeza dado pelo exame parasitológico - esfregaço por aposição e/ou cultivo.

O cálculo de sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos foi obtido considerando a matriz para cálculo de indicadores (GUIMARÃES et al., 1987) (Tabela 4).

**TABELA 4** - MATRIZ PARA CÁLCULO DOS INDICADORES PARA AS REAÇÕES SOROLÓGICAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.

TESTE	DOENTES	SADIOS	TOTAL
REAGENTE	A	C	A+C
NÃO REAGENTE	B	D	B+D
TOTAL	A+B	C+D	A+B+C+D

Onde: SENSIBILIDADE =  $A/A+B$   
 ESPECIFICIDADE =  $D/C+D$

Foi estabelecido ainda o índice de concordância (IC) entre as técnicas de diagnóstico de Imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático, para cada antígeno, conforme a equação abaixo:

$$IC = \frac{n^{\circ} \text{ soros positivos nos dois testes} + n^{\circ} \text{ soros negativos para ambos}}{\text{Total de soros analisados}}$$

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram analisadas 113 pessoas, 66 (58,4%) homens e 47 (41,6%) mulheres. Destas, 87 (76,3%) eram portadores de lesões compatíveis com leishmaniose (grupo I). Neste grupo, 87,4% pacientes (76/87) eram provenientes do Município de Prudentópolis distribuídos pelas localidades de Inferninho (02), Jaciaba (19), Postinho (10), Ligação (24), Vitorino (03), São Francisco (03), São Francisquinho (01), Macacos (05), Ivaí Boa Vista (02), Cachoeirinha (03), Moreiras (01), Rio Preto (01), Herval Grande (01), indeterminado (01). Onze (12,6%) pacientes eram provenientes de outros municípios, encaminhados pelo Hospital de Clínicas da UFPR. Destes, dois (02) eram oriundos do Município de Turvo, um (01) do Município de Pinhão, dois (02) do Município de Castro, um (01) do Município de Ibaiti e cinco (05) de procedência ignorada.

Em 26 (23,0%) pessoas provenientes do Município de Prudentópolis nas localidades de Postinho (03), Ligação (10), Jaciaba (05), Serra Esperança (05), Cachoeirinha (01), São Francisquinho (01), Macacos (01) foram realizados exames sorológicos (IFI, ensaio imunoenzimático e *Western blotting*).

#### 3.2. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

De um total de 87 pacientes com diagnóstico clínico, 61 (70,1%) apresentaram diagnóstico positivo pela presença de formas amastigotas nas células parasitadas (esfregaço e/ou *in print*) (Grupo II). Na cultura, 61 (70,1%) pacientes foram positivos pelo desenvolvimento de formas promastigotas após 07, 14 ou 21 dias de repiques sucessivos em meio de cultivo. Considerando os dois métodos, o número de pacientes com diagnóstico positivo foi de 69 (79,3%).

### 3.3. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* sp.

#### 3.3.1. Em meio NNN (*Novy-MccNeal-Nicolle*)

Do segundo ao décimo dia de incubação foi observada variação morfológica dos parasitos dentre os cultivos para as duas espécies: formas alongadas (fusiforme), em divisão e as globosas (em degeneração). Estas últimas apresentam pouca mobilidade enquanto as duas primeiras correspondem às formas móveis. Além da variação morfológica foi observado que o rendimento de promastigotas variou em relação à espécie e componentes nutritivos presentes no meio (Figura 1).

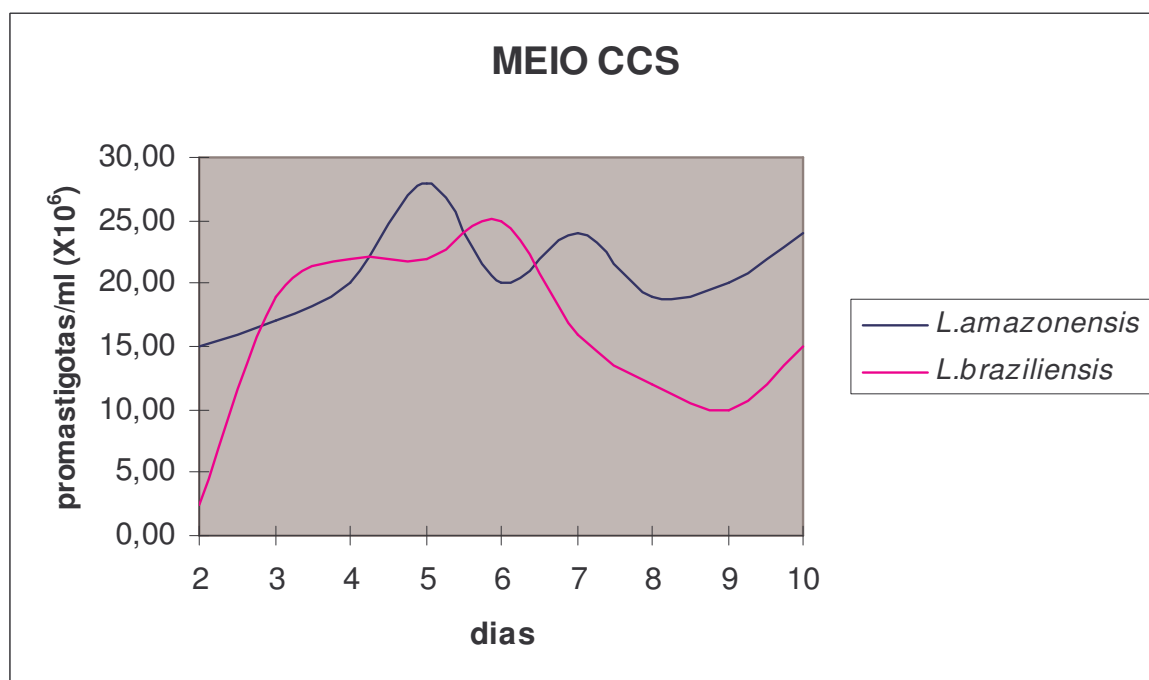
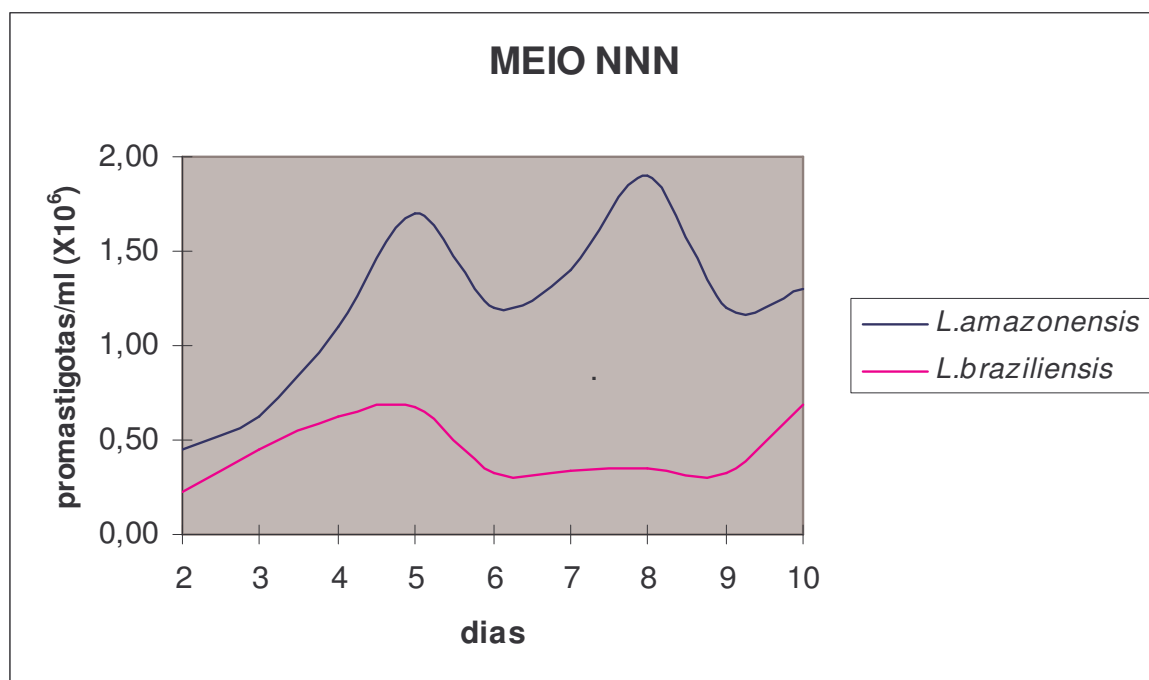
As formas promastigotas de *Leishmania* cultivadas em meio NNN apresentaram um crescimento regular e uma sobrevida de dez dias. O meio é menos enriquecido e os nutrientes disponíveis podem ser utilizados totalmente pelos parasitos. De um modo geral predominaram as formas alongadas até o décimo dia, quando também as formas globosas começam a ser observadas devido ao declínio das condições nutricionais. As formas em divisão estavam presentes no meio, porém, em proporção menor.

O comportamento das espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, cultivadas em meio NNN foi bastante semelhante (Figura 1).

#### 3.3.2. Em meio CCS (Coração-Cérebro-Sangue)

A taxa de multiplicação foi mais elevada entre o quinto e o sexto dias tanto para *L. braziliensis* como para *L. amazonensis* (Figura 1). A partir do nono e décimo dias, mais de 50% das culturas são de formas em degeneração.

**FIGURA 1** – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis* E *Leishmania braziliensis* EM MEIO NNN E EM MEIO CCS



### 3.4. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

#### 3.4.1. Padronização da Técnica de Imunofluorescência indireta (IFI)

Foi estabelecido o período ótimo do cultivo para produção dos antígenos de *Leishmania* sp com meio CCS e retirada no período de seis dias. O antígeno foi diluído em solução de PBS pH 7,2. Após análise de leitura em outras diluições, obteve-se a concentração ideal do antígeno em torno de  $3 \times 10^6$  promastigotas/mL. As amostras de soros humanos foram avaliadas em diluição 1:20 e 1:40 para triagem. Aqueles soros que apresentaram títulos positivos nestas duas diluições foram titulados até 1/640. Todos os testes foram realizados em triplicata e acompanhados de controles negativo e positivo. Quanto ao conjugado, anti-Imunoglobulina G humana, foi utilizado na diluição de 1:150 (conforme padronização prévia) em solução Azul de Evans a 0,1%.

#### 3.4.2. Padronização da Técnica de Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A combinação ideal de concentração de antígeno, diluição de soro e de conjugado, permitindo a melhor diferenciação entre positivo e negativo foi escolhida para uso no teste. Desta forma, padronizou-se a concentração de 500ng/pocinho para os antígenos, diluição do conjugado a 1:1000 e diluição dos soros a 1:50.

O nível de corte da reação entre reagentes e não reagentes foi calculado com base na média das densidades ópticas ( $\omega$ ) dos soros de pessoas procedentes de região indene para a doença, acrescido três vezes o valor de desvio padrão (s). Os valores obtidos foram 0,22 para *L. (L.) amazonensis* e 0,11 para *L. (V.) braziliensis*.

### 3.4.3. Análise dos soros pelas técnicas de Imunofluorescência (IFI) e Ensaio imunoenzimático (ELISA)

De 87 pacientes com diagnóstico clínico e portadores de LTA (Grupo I), foram realizados 81 exames sorológicos pelas reações de Imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA).

Pela técnica de IFI com antígeno de *Leishmania braziliensis*, 65/81 (80,2%) pacientes foram sororreagentes com títulos iguais ou superiores a 1/40 (Tabela 05), sendo 28 soros com título 1/40, 23 com título 1/80, onze (11) com título 1/160, três (02) com título 1/320 e um (01) com título 1/640. Quando utilizado antígeno de *Leishmania amazonensis*, 27 amostras foram reagentes (77,1%) de 35 testes realizados, sendo 16 soros com título 1/40 e onze com título 1/80.

No ensaio imunoenzimático de 81 pacientes, 72 (88,9%) foram reagentes somente para o antígeno de *Leishmania braziliensis* e 57 (70,4%) somente para o antígeno de *Leishmania amazonensis* (Tabela 05).

No Grupo III, 13 pessoas sem sinais clínicos de leishmaniose tegumentar, todas da mesma região de transmissão e sujeitos às mesmas condições que pessoas portadoras de leishmaniose, foram analisadas pelo ensaio imunoenzimático para os antígenos de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* (Tabela 05). Deste grupo, três pessoas foram sororreagentes para essa técnica para os dois antígenos: *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*. Somente um foi soro negativo para os dois antígenos e outros nove soros negativos contra o antígeno de *Leishmania amazonensis* e outro soro negativo somente para *Leishmania braziliensis*. Dez pacientes foram sororreagentes apenas para o antígeno de *Leishmania braziliensis*. O mesmo grupo analisado pela técnica de IFI, dois soros foram reagentes para o antígeno de *Leishmania amazonensis* e quatro foram reagentes para o antígeno de *Leishmania braziliensis*.

Na pesquisa de anticorpos no soro de 13 pessoas sem sinais clínicos de leishmaniose tegumentar provenientes de área indene (Grupo IV), não houve reação a qualquer dos antígenos pela técnica de IFI. Um soro reagiu aos antígenos pelo ensaio imunoenzimático (Tabela 05), entretanto, este soro reagente (pessoa do sexo feminino, 26 anos de idade) apresentou-se no *bord*

line para o antígeno de *Leishmania amazonensis* e para o antígeno de *Leishmania braziliensis*.

Foram analisados pacientes portadores de outras etiologias confirmadas por biópsia ou isolamento do agente etiológico em cultivo (Grupo V): 30 pacientes com Paracoccidioidomicose (Grupo V a), 10 pacientes com Doença de Chagas (Grupo V b) e 08 pacientes com Toxoplasmose (Grupo V c) (Tabela 05).

**TABELA 05** - DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PELOS MÉTODOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA (IFI) E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) DOS GRUPOS ESTUDADOS.

AMOSTRAGEM		METODOLOGIA							
Grupos clínicos		IFI <i>L.a</i>		IFI <i>L.b</i>		ELISA <i>L.a</i>		ELISA <i>L.b</i>	
	n	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
I	81	27**	08	65	16	57	24	72	09
II	60	21**	07	55	05	43	17	57	03
III	13	02	11	04	09	03	10	11	02
IV	13	00	13	00	13	02	11	01	12
V a	30	01**	23	01**	23	21	09	13	17
V b	10	07	03	08	02	09	01	08	02
V c	08	08	00	01	07	01	07	04	04

Grupos: Pessoas com lesões compatíveis com leishmaniose tegumentar (LT) (I); Pessoas com leishmaniose (LT) confirmada parasitologicamente (II); Moradores da região de transmissão e sem sinais clínicos de LT (III); Pessoas de região indene/população saudável (IV); Portadores de: Paracoccidioidomicose (V a); Doença de Chagas (V b) e Toxoplasmose (V c). IFI: Imunofluorescência Indireta; ELISA: ensaio imunoenzimático; *L.a.* *Leishmania amazonensis*; *L.b.*: *Leishmania braziliensis*.

\*\*Amostragem parcial para os testes, n=35 (GI) e n=28 (GII).

#### 3.4.4. Sensibilidade e especificidade das técnicas de Imunofluorescência indireta e Ensaio imunoenzimático.

Para cálculo de sensibilidade, foram considerados 60 soros de pacientes cujo diagnóstico para leishmaniose tegumentar foi comprovado por exame parasitológico direto e/ou indireto. O cálculo de especificidade foi realizado com base na análise sorológica de pessoas provenientes da região de Curitiba (n=13). Por ensaio imunoenzimático, 57/60 soros de pacientes foram reagentes para o antígeno de *Leishmania braziliensis* (sensibilidade de



95,0%). Para o antígeno de *Leishmania amazonensis* 43/60 foram reagentes (sensibilidade de 71,7%) (Tabela 06).

A especificidade da técnica de IFI foi de 100,0% (00/13) para o antígeno de *Leishmania. braziliensis* e 100,0% (00/13) para o antígeno de *Leishmania amazonensis*. Pela técnica de ensaio imunoenzimático, a especificidade foi de 92,3% (01/13) para o antígeno *Leishmania braziliensis* e 84,6% (02/13) para o antígeno de *Leishmania amazonensis* (Tabela 06).

**TABELA 06** – SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS TÉCNICAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA (IFI) E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA 60 SOROS DE PACIENTES CUJO DIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR (LT) FOI COMPROVADO PELO EXAME PARASITOLÓGICO E FRENTE A 13 SOROS DE PESSOAS DE ÁREA INDENE.

	IMUNOFLUORESCÊNCIA				ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO			
	<i>L.amazonensis</i>		<i>L.braziliensis</i>		<i>L.amazonensis</i>		<i>L.braziliensis</i>	
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
DOENTES N=60	21**	07	55	05	43	17	57	03
SADIOS N=13	00	13	00	13	02	11	01	12
SENSIBILIDADE	75,0%		91,7%		71,7%		95,0%	
ESPECIFICIDADE	100,0%		100,0%		84,6%		92,3%	

\*\*Teste realizado com amostragem parcial

Comparando os resultados da sorologia dos pacientes com diagnóstico clínico àqueles com diagnóstico parasitológico, observa-se que o percentual de soros positivos aumentou pelas técnicas de IFI, de 80,2% para 91,7% e no ensaio imunoenzimático de 88,9% para 95,0%, respectivamente usando o antígeno de *Leishmania braziliensis*. Para o ensaio imunoenzimático utilizando o antígeno de *Leishmania amazonensis*, o percentual manteve-se muito próximo de 70,4% para 71,7%. Na reação de IFI, a sensibilidade foi de 75,0% para este antígeno.

Daqueles pacientes cujo diagnóstico não foi confirmado por exame parasitológico (18/84), dois apresentaram contaminação bacteriana ou leveduriforme na amostra, impossibilitando a análise. Entretanto, mostraram-se sororeagentes na Imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático (para os antígenos *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*). Outros cinco

pacientes foram igualmente sororeagentes para IFI e ensaio imunoenzimático. Apenas três pacientes foram soros negativos em IFI e ensaio imunoenzimático, confirmando o resultado no exame parasitológico. Um paciente foi soro reagente apenas para IFI e outros sete pacientes foram sororeagentes apenas para o ensaio imunoenzimático, sendo cinco para os dois antígenos e dois somente para o antígeno de *Leishmania amazonensis*. Um paciente foi soro reagente para antígenos de *Leishmania braziliensis*, por Imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático (Anexo11).

#### 3.4.5. Concordância entre as técnicas de Imunofluorescência indireta e Ensaio imunoenzimático

O índice de concordância entre as técnicas foi calculado considerando os 60 soros de pacientes comprovadamente portadores de leishmaniose tegumentar. A comparação de resultados das duas técnicas para esta amostragem é mostrada na tabela 07. A amostragem analisada com antígeno de *Leishmania amazonensis* foi parcial e o resultado obtido, proporcional a esta.

**TABELA 07** - COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS IFI E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO COM ANTÍGENO DE *L. amazonensis* E *L. braziliensis* CONTRA 60 SOROS DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

		ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO			
		<i>L. amazonensis</i>		<i>L. braziliensis</i>	
IFI	R	R	NR	R	NR
		NR	04	03	03
TOTAL		28		60	

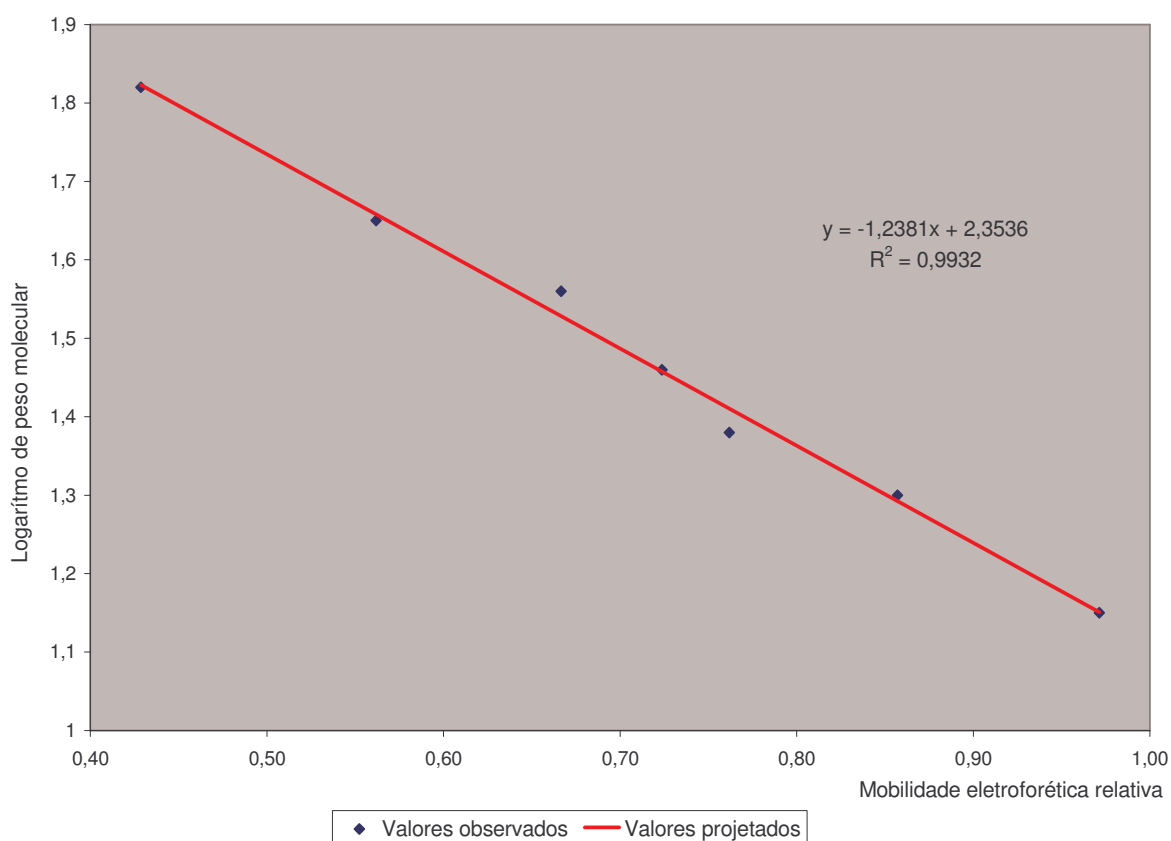
R: reagente; NR: não reagente

A concordância entre as técnicas de IFI e ensaio imunoenzimático para o antígeno de *Leishmania braziliensis* foi de 0,90 e 0,71 proporcionalmente para o antígeno de *Leishmania amazonensis*.

### 3.5. TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING

As análises pela técnica de *Western blotting* foram feitas utilizando os antígenos *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O cálculo do peso molecular das proteínas reveladas foi realizado com base na equação da reta obtida conforme a mobilidade eletroforética das proteínas padrão de peso molecular conhecido (Figura 2).

**FIGURA 2** - MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS COM PESO MOLECULAR CONHECIDO PARA OBTENÇÃO DA EQUAÇÃO DA RETA PADRÃO.



#### 3.5.1. Análise dos soros de pacientes contra antígeno de *Leishmania braziliensis*.

A análise de *Western blotting* dos soros de pacientes portadores de leishmaniose com o antígeno de *Leishmania (Viannia) braziliensis* revelou 20 proteínas de peso molecular entre 16,6 Kda a 218,8 Kda (Anexo 14). Dos 60

soros estudados, as proteínas com peso molecular de 177,8 Kda e 169,8 Kda foram as mais prevalentes sendo reconhecidas por 58 (96,6%) e 57 (95,0%) soros, respectivamente, seguidas pelas proteínas de peso molecular 112; 61,6; 120 e 134,8 Kda (Tabela 8).

No soro das 13 pessoas sem sinais clínicos de leishmaniose tegumentar da região de Prudentópolis e com algum nível de parentesco com os doentes (indivíduos comunicantes) (Anexo 15) não foram detectadas proteínas de peso molecular 218,8; 85; 70,8; 56; 53,7 e 17,4 Kda (Tabela 8).

Das 16 proteínas reveladas, 14 foram detectadas em apenas um soro (LPM100). As proteínas de peso molecular 177,8 Kda (oito soros), 169,8 Kda (sete soros) e 199,5 Kda (três soros) foram as mais prevalentes. As proteínas de peso molecular 48,9 e 46,6 Kda só estão presentes neste grupo. Em apenas um soro (LPM100) foram reveladas 14 proteínas entre 46,6 e 177,8 Kda. Em três soros (LPM104, LPM107 e LPM108) não foram detectadas bandas. Em soro de pessoas sem sinais clínicos de leishmaniose tegumentar provenientes de área indene (indivíduos sadios), as proteínas reveladas foram diferentes daquelas detectadas nos pacientes com leishmaniose tegumentar (Tabela 8).

Quatro proteínas foram reveladas, todas de proteínas de alto peso molecular (194,9 a 162,2 Kda). A proteína com peso molecular de 173,8 Kda foi reagente para seis soros, sendo que um destes soros revelou também banda para a proteína de 162,2 Kda. Dois soros reagiram com a proteína de 184,5 Kda, sendo que um destes soros reagiu também com a proteína de 173,8 Kda. Apenas um soro revelou a banda de 194,9 Kda (Anexo16).

**TABELA 08** – PERCENTUAL DA PREVALÊNCIA DAS PROTEÍNAS RECONHECIDAS NA PESQUISA DE ANTICORPOS COM ANTÍGENO DE *Leishmania braziliensis* NO SORO DE PESSOAS DOENTES, COMUNICANTES E SADIAS PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING.

PROTEÍNAS	% DE RECONHECIMENTO		
	DOENTES	COMUNICANTES	SADIOS
218,8	8,3	0,0	0,0
199,5	3,3	23,1	0,0
177,8	96,6	61,5	0,0
169,8	95,0	53,8	0,0
158,5	8,3	7,7	0,0
154,9	3,3	7,7	0,0
148,0	3,3	7,7	0,0
135,0	20,0	7,7	0,0
125,9	1,7	7,7	0,0
120,0	30,0	7,7	0,0
112,0	38,3	7,7	0,0
104,7	13,3	7,7	0,0
95,5	1,7	7,7	0,0
85,0	1,7	7,7	0,0
70,8	1,7	0,0	0,0
61,6	30,0	0,0	0,0
56,0	1,7	0,0	0,0
53,7	3,3	0,0	0,0
48,9	0,0	7,7	0,0
46,8	0,0	7,7	0,0
17,4	10,0	0,0	0,0
16,6	15,0	7,7	0,0
	N=60	N=13	N=13

A análise de *Western blotting* dos soros de pacientes portadores de outras etiologias revelou nove proteínas de peso molecular entre 58,9 e 151,0 Kda (Tabela 09). Os soros de pacientes com Doença de Chagas reconheceram as proteínas de peso molecular 93,3; 135; 141; 148 e 151Kda. Duas proteínas de peso molecular 135,0 e 148,0 Kda são reconhecidas nos soros de pacientes com Doença de Chagas e soro de pacientes com leishmaniose. As proteínas de peso molecular 58,9; 63,0; 70,8 e 81,3 Kda foram detectadas nos soros dos pacientes com PCM. Uma proteína de peso molecular 70,8 Kda foi reconhecida em soro de pacientes com PCM e leishmaniose. As demais proteínas não foram detectadas pelo soro de pacientes com leishmaniose, indicando que há pouca reação cruzada entre as proteínas destes diferentes antígenos. Nenhuma banda foi detectada nos soros dos pacientes com toxoplasmose (Tabela 09).

**TABELA 09** - PROTEÍNAS RECONHECIDAS NA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* COM ANTÍGENO DE *Leishmania braziliensis* NO SORO DE PESSOAS COM LEISHMANIOSE, E NO POOL DE SOROS DE PESSOAS COM OUTRAS PATOLOGIAS PELA TÉCNICA DE *WESTERN BLOTTING*

PROTEÍNAS PM (Kda)	GRUPOS CLÍNICOS			
	LEISHMANIOSE	PARACOCCIDIOIDO MICOSE	DOENÇA DE CHAGAS	TOXOPLASMOSE
218,8	X	-	-	-
199,5	X	-	-	-
177,8	X	-	-	-
169,8	X	-	-	-
158,5	X	-	-	-
154,9	X	-	-	-
151,0	-	-	X	-
148,0	X	-	X	-
141,0	-	-	X	-
135,0	X	-	X	-
125,9	X	-	-	-
120,0	X	-	-	-
112,0	X	-	-	-
104,7	X	-	-	-
95,5	X	-	-	-
93,3	-	-	X	-
85,0	X	-	-	-
81,3	-	X	-	-
70,8	X	X	-	-
63,0	-	X	-	-
61,6	X	-	-	-
58,9	-	X	-	-
56,0	X	-	-	-
53,7	X	-	-	-
17,4	X	-	-	-
16,6	X	-	-	-

### 3.5.2. Análise dos soros de pacientes contra antígeno de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A análise de *Western blotting* dos 60 soros de pacientes com diagnóstico parasitológico direto e/ou indireto de leishmaniose com o antígeno de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* revelou 26 proteínas de peso molecular entre 23,9 Kda a 173,7 Kda (Anexo 17).

Dos 60 soros estudados, as proteínas com peso molecular de 83,1Kda e 79,4 Kda tiveram maior prevalência sendo reconhecidas por 50

soros (83,3%), seguidas pelas proteínas de peso molecular 75,8; 74,1; 33,9; 33,1; 30,9 e 29,5 Kda (Tabela 10). Observa-se que apesar de um grande número de proteínas reveladas por este antígeno, as proteínas detectadas formam dois grupos bem homogêneos de peso molecular entre 29,5 a 33,9 Kda em um grupo de proteínas de peso molecular 74,1 a 83,1Kda.

No soro dos 13 pessoas sem sinais clínicos de leishmaniose tegumentar da região de Prudentópolis (grupo comunicante), não foram detectadas proteínas de peso molecular 89,1; 69,1; 63; 46,7; 40,7 e 23,9 Kda (Anexo 18). Das 20 proteínas reveladas, as de peso molecular 74,1; 75,8; 79,4 e 83,1Kda tiveram maior prevalência (10/20). Um outro grupo foi formado pelas proteínas de peso molecular 33,9; 33,1; 30,9 e 29,5 Kda (Tabela 10).

Em 13 soros de pessoas residentes em área indene (Anexo 19) foram reveladas cinco proteínas iguais às detectadas nos pacientes com leishmaniose tegumentar. As proteínas prevalentes foram as de peso molecular 30,9; 33,9 e 74,1. Em seguida as proteínas de 75,8 e 173,7 Kda.

A análise de *Western blotting* dos soros de pacientes portadores de outras etiologias revelou 18 proteínas de peso molecular entre 19,0 e 170,0 Kda. As proteínas de peso molecular 63,0; 100,0; 123,0 e 138,0 Kda foram iguais àquelas reveladas pelos soros de pacientes com leishmaniose tegumentar. Os soros de pacientes com Doença de Chagas revelaram as mesmas proteínas mostrando elevada taxa de reação cruzada entre os antígenos. As proteínas de peso molecular 56,0; 63,0; 145,0 e 170,0 Kda foram detectadas nos soros dos pacientes com PCM. As proteínas de peso molecular 63,0 e 144,5 Kda foram comuns aos soros dos pacientes de LTA. Uma proteína foi detectada nos soros dos pacientes com toxoplasmose, mas não se trata de proteína encontrada nos soro dos pacientes com LTA (Tabela 11).

**TABELA 10** – PERCENTUAL DA PREVALÊNCIA DAS PROTEÍNAS RECONHECIDAS NA PESQUISA DE ANTICORPOS COM ANTÍGENO DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* NO SORO DE PESSOAS DOENTES, COMUNICANTES E SADIOS PELA TÉCNICA DE *WESTERN BLOTTING*.

PROTEÍNAS PM (Kda)	% DE RECONHECIMENTO		
	DOENTES	COMUNICANTES	SADIOS
173,7	53,3	15,4	7,7
154,9	21,6	7,7	0,0
151,3	51,6	15,4	0,0
144,5	46,6	23,1	0,0
141,2	50,0	23,1	0,0
138,0	48,3	7,7	0,0
123,0	20,0	23,1	0,0
114,8	25,0	15,4	0,0
112,2	46,6	46,1	0,0
109,6	50,0	46,1	0,0
104,7	25,0	7,7	0,0
100,0	13,3	7,7	0,0
89,1	25,0	0,0	0,0
83,1	83,3	76,9	0,0
79,4	83,3	76,9	0,0
75,8	81,6	76,9	38,0
74,1	81,6	76,9	61,5
69,1	10,0	0,0	0,0
63,0	5,0	0,0	0,0
46,7	40,0	0,0	0,0
40,7	6,6	0,0	0,0
33,9	80,0	53,8	46,1
33,1	80,0	53,8	0,0
30,9	80,0	53,8	46,1
29,5	80,0	53,8	0,0
23,9	6,6	0,0	0,0
	N=60	N=13	N=13



**TABELA 11** – PROTEÍNAS RECONHECIDAS NA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* COM ANTÍGENO DE *Leishmania amazonensis* NO SORO DE PESSOAS COM LEISHMANIOSE E NO POOL DE SOROS DE PESSOAS COM OUTRAS PATOLOGIAS PELA TÉCNICA DE *WESTERN BLOTTING*

PROTEÍNAS PM (Kda)	GRUPOS CLÍNICOS			
	LEISHMANIOSE	PARACOCCIDIOIDO MICOSE	DOENÇA DE CHAGAS	TOXOPLASMOSE
173,7	X	-	-	-
170,0	-	X	-	-
158,0	-	-	X	-
154,9	X	-	-	-
151,3	X	-	-	-
144,5	X	X	-	-
141,2	X	-	-	-
138,0	X	-	X	-
135,0	-	-	X	-
126,0	-	-	X	X
123,0	X	-	X	-
114,8	X	-	-	-
112,2	X	-	-	-
109,6	X	-	-	-
104,7	X	-	-	-
100,0	X	-	X	-
89,1	X	-	-	-
85,0	-	-	X	-
83,1	X	-	-	-
79,4	X	-	-	-
75,8	X	-	-	-
74,1	X	-	-	-
70,8	-	-	X	-
69,1	X	-	-	-
63,0	X	X	X	-
56,0	-	X	X	-
52,5	-	X	X	-
47,8	-	X	-	-
46,7	X	-	-	-
40,7	X	-	-	-
33,9	X	-	-	-
33,1	X	-	-	-
30,9	X	-	-	-
29,5	X	-	-	-
25,0	-	-	X	-
23,9	X	-	-	-
22,9	-	-	X	-
21,8	-	-	X	-
19,0	-	-	X	-

#### 4. DISCUSSÃO

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em áreas endêmicas e epidêmicas freqüentemente é baseado no diagnóstico clínico, algumas vezes combinado com exames parasitológicos e/ou imunológicos, nem sempre eficazes. A busca por métodos diagnósticos que sejam de fácil execução, rápidos, sensíveis e específicos poderia melhorar o diagnóstico diminuindo a ocorrência de falso-negativos e o tempo de obtenção de resultados.

Os métodos tradicionais de diagnóstico envolvem a detecção de amastigotas nos exames de esfregaço e histopatológico de tecidos e cultura de promastigotas (parasitológico).

Neste trabalho um total de 113 pacientes com diagnóstico clínico e portadores de lesões compatíveis com leishmaniose, 87 foram examinados e 70,1% apresentaram-se positivos por um dos dois métodos - esfregaço e cultura. Estas metodologias são de grande valor por identificarem a presença do parasito, embora este último método possa levar uma semana ou mais para obtenção de resultados (REED, 1996). *Faber et al.*, 2003, em estudo prospectivo, consideram os métodos tradicionais de diagnóstico como nem sempre conclusivos em pacientes com diagnóstico clínico de LT e avaliam ser a cultura mais sensível que os demais métodos diretos.

Outros métodos diretos seriam a prova de hibridização de DNA e uso de anticorpo monoclonal que não foram utilizados neste trabalho.

Os métodos indiretos de diagnóstico são os imunológicos que incluem a sorologia e o teste intradérmico. Estes testes são realizados com a utilização de parasitas íntegros ou extratos e constituem valiosa ferramenta no diagnóstico da LT. As técnicas empregadas para diagnóstico sorológico das amostras neste trabalho foram a técnica de Imunofluorescência indireta – IFI, ensaio imunoenzimático – ELISA e *Western blotting*. Enquanto que a primeira técnica utiliza antígenos íntegros, o ensaio imunoenzimático e o *Western blotting* utilizam extratos do parasito. Entretanto, no ensaio imunoenzimático o antígeno é aplicado em solução bruta e na análise por *Western blotting* as

proteínas do antígeno são separadas eletroforéticamente. A reação final é capaz de identificar quais as proteínas mais imunogênicas.

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies de *Leishmania* empregadas na produção dos antígenos para diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar - *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* - pertencem a subgêneros distintos e apresentam especificidades morfológicas, bioquímicas e, sobretudo, nas formas clínicas (LAINSON & SHAW, 1987). Enquanto *Leishmania (L) amazonensis* é responsável pela manifestação cutânea e cutâneo-difusa da doença, a segunda espécie é causadora das formas cutânea e cutâneo-mucosa da leishmaniose tegumentar.

Com a finalidade de padronizar a produção dos antígenos de *Leishmania*, o comportamento *in vitro* de ambas as espécies na sua forma promastigota, foi avaliado cultivando-as em dois meios de cultivo bifásicos distintos: meio de *Novy-McNeal e Nicolle* – NNN e meio Coração-Cérebro-Sangue – CCS, com períodos de incubação entre dois e dez dias.

O meio CCS, mais rico em nutrientes, proporcionou uma elevada taxa de multiplicação dos promastigotas já no segundo dia de cultivo das cepas. O meio NNN, pouco nutritivo proporcionou uma biomassa menos exuberante, embora a sobrevivência dos protozoários fosse mais longa. Quanto ao rendimento dos antígenos produzidos, a espécie *Leishmania amazonensis* foi significativamente maior quando comparado aos antígenos produzidos com *Leishmania braziliensis*. A primeira espécie é maior em tamanho e possui metabolismo mais acelerado.

A razão de escolha do meio bifásico CCS para a produção dos antígenos de *Leishmania sp* foi a possibilidade de obtenção de biomassa em menor tempo com maior rendimento, importante, sobretudo para os antígenos solúveis.

Amostras de soro de 81 pacientes (com diagnóstico clínico) foram submetidas à Imunofluorescência indireta com antígeno de *L. braziliensis*, 65 (80,2%) pacientes foram soro reagentes com títulos iguais ou superiores a 1/40 e com o antígeno de *L. amazonensis*, 77,1% (27/35). Romero et al., 2005 obtiveram 79,6% de sensibilidade no teste utilizando antígeno de *L.*

*amazonensis*, quando analisados soros de pacientes infectados com *L. braziliensis* e 71,7% em pacientes infectados com *L. guyanensis*. Britto et al., 2000, encontraram 52% de sensibilidade e 79% de especificidade, em um grupo de pessoas com diagnóstico clínico para leishmaniose.

Pelo ensaio imunoenzimático, 72/81 pacientes (88,9%) foram reagentes para o antígeno de *L. braziliensis* e 57/81 (70,4%) para o antígeno de *L. amazonensis* (níveis de corte para o ensaio de 0,11 e 0, 22, respectivamente).

Considerando 60 pacientes que tiveram o diagnóstico para Leishmaniose tegumentar confirmado por exame parasitológico, quando analisadas as amostras sorológicas por Imunofluorescência indireta com antígeno de *Leishmania braziliensis*, 55 pacientes foram sororreagentes (91,7% de sensibilidade) com títulos de 1/40 (36,4%), 1/80 (40,0%), 1/160 (20,0%) e 1/320 (3,6%). Diferentes fases da doença em que se encontrariam os pacientes no momento do diagnóstico clínico podem ser fatores determinantes para diferentes títulos de anticorpos. É sabido que na fase inicial da leishmaniose (um a quatro meses), anticorpos circulantes são pouco detectados por IFI (janela imunológica). Esta técnica foi empregada no estudo da soroprevalência da leishmaniose tegumentar em vários trabalhos no Brasil (MARZOCHI et al., 1980; PASSOS, 1999; SILVEIRA et al. 1996). No estado do Paraná, é a metodologia padrão para a pesquisa sorológica da LTA. A sensibilidade da técnica quando utilizado antígeno de *Leishmania amazonensis* foi de 75% (proporcionalmente ao número de soros avaliados).

Quando analisada a sensibilidade do ensaio imunoenzimático individualmente para os antígenos, 71,7% (43/60) foram reagentes pela técnica contra o antígeno de *Leishmania amazonensis* e contra o antígeno de *Leishmania braziliensis*, 95,0% (57/60) reagiram para o teste.

Os índices de concordância entre os resultados do teste de IFI e ensaio imunoenzimático (Tabela 07) neste grupo de pessoas com leishmaniose, mostraram resultados 0,90 para *L.braziliensis* e 0,71 para *L.amazonensis*. Outros autores tendo comparado as técnicas de IFI e ensaio imunoenzimático também verificaram boa concordância entre os resultados (EDRISSIAN e DARABIAN, 1979; GARCIA et al., 1990).

As 13 amostras do grupo comunicante pertencem a pacientes sem sinais clínicos para Leishmaniose, porém residentes na mesma região e sob as mesmas condições que os pacientes portadores da leishmaniose tegumentar. A reatividade sorológica destes pacientes contra antígeno de *Leishmania braziliensis* foi de 30,7% para a reação de IFI e 84,6% para o ensaio imunoenzimático. Estes resultados seriam sugestivos de contato prévio dessas pessoas com o antígeno sem que a doença fosse desenvolvida. A discrepância entre os resultados de IFI e ensaio imunoenzimático neste grupo, pode estar relacionada aos diferentes antígenos envolvidos nas reações, uma vez que os extratos de *Leishmania sp* envolvem antígenos não só de superfície, como também de núcleo, vacúolo, cinetoplasto e possivelmente outros, o que torna o teste mais sensível à detecção de anticorpos. Utilizando antígeno de *Leishmania amazonensis*, 15,3% (02/13) foram reagentes para IFI e 23% (03/13) para o ensaio imunoenzimático.

Para o cálculo de especificidade foram analisados soros de indivíduos sadios (n=13) todos residentes em área livre de Leishmaniose ou Doença de Chagas. Nenhum dos indivíduos apresentava histórico para essas doenças ou qualquer lesão compatível, ou estiveram em regiões endêmicas para as mesmas. Para o teste de Imunofluorescência Indireta, a especificidade foi de 100,0%, 92,3% para o ensaio imunoenzimático com antígeno de *L. braziliensis* e 84,6% com antígeno de *L. amazonensis*.

No presente estudo foi possível constatar maior sensibilidade no ensaio imunoenzimático em relação ao teste de Imunofluorescência Indireta. Entretanto, a determinação de anticorpos não pode ser usada isoladamente para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas. Soros de pacientes em fases diferentes de tratamento reagem de modo distinto para as técnicas sorológicas (CHIARI et al., 1973a, b; MENDONÇA et al., 1988). Monroy-Ostria et al., 1997, relata que em torno de 30% dos pacientes tem títulos similares àqueles dos sadios na área endêmica.

Pacientes portadores de outras patologias, com diagnóstico confirmado para: Paracoccidiodomicose (n=30); portadores de Doença de Chagas (n=10) de diversas localidades do Paraná e Toxoplasmose (n=08) da região de Curitiba foram submetidos ao ensaio imunoenzimático e

Imunofluorescência Indireta para ambos os antígenos. Estes grupos clínicos foram escolhidos para avaliação de reatividade ante as técnicas sorológicas do presente trabalho, em razão de serem patologias de alguma forma relacionadas à leishmaniose: *Leishmania*, *Toxoplasma gondii* e *Paracoccidioides brasiliensis* são patógenos intracelulares e embora pertencentes a grupos distintos (os dois primeiros são protozoários e o último, um fungo dimórfico), poderia haver semelhanças quanto à resposta imunológica do hospedeiro à presença de qualquer destes parasitos. Alguns trabalhos mostram reatividade cruzada entre antígeno de *Leishmania sp* e anticorpos de pacientes portadores de micoses profundas como a esporotricose (BARROS et al. 2005) e paracoccidioidomicose (SCHUBACK et al., 2001) onde estas doenças compartilham da mesma região de transmissão. *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* são protozoários pertencentes à mesma família (Trypanosomatidae) e, apesar de apresentarem manifestações clínicas distintas, apresentam alta reatividade cruzada, classicamente referida em vários trabalhos (CAMARGO & REBONATO, 1969; CHILLER et al., 1990; MALCHIODI et al., 1994). Possivelmente os tripanosomatídeos detêm proteínas antigênicas comuns ao grupo o que dificultaria a diferenciação no simples diagnóstico sorológico. Alguns autores ainda referem-se a ocorrências de infecções mistas em áreas onde esses protozoários coexistem (CHILLER et al., 1990; MALCHIODI et al., 1994).

Dos 30 pacientes com paracoccidioidomicose, 70,0% apresentaram soro reatividade para o antígeno de *L. amazonensis* contra 43,0% para o antígeno de *L. braziliensis*. Na reação de IFI, somente um soro foi reagente com título 1/40 com qualquer dos antígenos. Outros sete soros foram reativos a 1/20. De dez soros de pacientes com diagnóstico de certeza para Doença de Chagas, apenas um não reagiu ao antígeno de *L. amazonensis* e dois não reagiram a *L. braziliensis* para o ensaio imunoenzimático, sete soros foram reagentes para *Leishmania amazonensis* e seis para *Leishmania braziliensis*. De oito soros de pacientes com diagnóstico de Toxoplasmose da região de Curitiba, zona indene para LTA, um soro foi reagente ao antígeno de *L. amazonensis* e quatro soros foram reagentes ao antígeno de *L. braziliensis*,

Porém, os valores de absorvância para estes soros estavam muito próximos ao valor do ponto de corte para o teste.

A técnica de *Western blotting* foi realizada com os mesmos antígenos de extratos solúveis de *Leishmania* utilizados no ensaio imunoenzimático. O princípio das duas técnicas é basicamente o mesmo, entretanto, a vantagem do *Western blotting* está na capacidade de detectar especificamente as proteínas mais antigênicas dos extratos solúveis quando confrontados com soros de pacientes.

Na análise de *Western blotting*, foram utilizadas 60 amostras de soros de pacientes portadores de LTA com diagnóstico parasitológico. Os mesmos soros de pacientes foram também analisados por Imunofluorescência Indireta e ensaio imunoenzimático.

Com antígeno de *Leishmania braziliensis*, das 20 proteínas de peso molecular entre 16,6 e 218,8 Kda, as de maior prevalência foram as de alto peso molecular (tabela 08), sobretudo as de 177,8 (96,6%) e 169,8 (95,0%). Em seguida estão as proteínas de 112,0 Kda (38,0%), 120,0 e a de 61,6 Kda (ambas com 30% de ocorrência) e a de 134,8 Kda (20,0%).

A maior prevalência das proteínas reveladas de alto peso molecular poderia incluir reações inespecíficas. Reed et al., 1986 sugerem que as glicoproteínas de alto peso molecular seriam encontradas, sobretudo no flagelo de *Leishmania* sp.

Quando analisado o grupo de comunicantes, novamente as proteínas 177,8 e 169,8 Kda foram prevalentes (08 e 07 soros respectivamente), coincidindo com o que foi observado no grupo de portadores de LTA. Este fato poderia indicar contato destas pessoas com o antígeno sem desenvolver sintomatologia (portadores assintomáticos). Uma amostra de soro do grupo assintomático cuja reação sorológica revelou 14 proteínas, entre 46,6 e 177,8 Kda, poderia estar num estágio que antecede o desenvolvimento da doença, uma vez que foram reveladas proteínas que só apareceram no grupo de portadores da doença. Este caso mereceria maior atenção, sendo necessária análise de novas amostras em diferentes períodos.



Nenhuma das proteínas reconhecidas nos soros do grupo de área indene, coincide com as proteínas reveladas nos outros dois grupos acima. Quatro proteínas de alto peso molecular foram reveladas (194,9 a 162,2 Kda). A proteína de 173,8 Kda foi reagente para seis soros e a mesma proteína aparece como reativa nos três grupos (doentes, comunicantes e sadios) para o antígeno de *L. amazonensis*.

A análise de *Western blotting* com antígeno de *L. braziliensis* em amostras de soros de pacientes portadores de outras etiologias revelou proteínas com peso molecular entre 58,9 e 151,0 Kda. Proteínas de alto peso molecular foram reconhecidas por pacientes com Doença de Chagas: 93,3; 135,0; 141,0; 148,0 e 151,0 Kda. As proteínas de 135,0 e 148,0 Kda são reconhecidas no soro de pacientes com LTA. Proteínas de 58,9; 63,0; 70,8 e 81,3 Kda foram reconhecidas por soros de pacientes com paracoccidiodomicose e somente a de 70,8 Kda foi reconhecida também por soros de pacientes portadores de leishmaniose. Proteínas 70-72 Kda têm sido identificadas como membros das famílias de proteínas de regiões de DNA altamente conservadas, sendo reconhecidas também por soros de pacientes com leishmaniose visceral além de outras doenças como tuberculose, toxoplasmose e hidatidose (AISA et al., 1998). Em outros trabalhos, esta proteína foi reportada como um grande componente antigênico de superfície (LEGRAND et al., 1987; KUTNER et al., 1988; CUBA-CUBA et al., 2001). Kutner et al., 1991 e Legrand et al., 1987, consideram esta proteína como antigenicamente específica de *L. braziliensis*, embora essa especificidade não tenha sido observada no presente estudo. Nenhuma banda protéica foi revelada por soros de pacientes com Toxoplasmose.

A análise de *Western blotting* para o antígeno de *Leishmania amazonensis*, revelou 26 proteínas de peso molecular entre 23,9 e 173,7 Kda. Os dois grupos de proteínas prevalentes: 74,1-83,1 Kda e 29,5-33,9 Kda que aparecem homoganeamente nos pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, foram reveladas também no soro de pessoas assintomáticas. Essas proteínas não seriam exatamente indicativas de doença, mas sim de contato prévio dessas pessoas com os antígenos. Entretanto, no grupo de pessoas de região indene para Leishmaniose, dezoito proteínas



foram reveladas de igual peso molecular que as detectadas no grupo de pessoas com LTA. As proteínas de 29,5; 30,9; 33,1; 33,9; 74,1 e 75,8 Kda mostraram alta prevalência nos três grupos: doentes, comunicantes e sadios.

Os soros de pacientes portadores de outras etiologias revelaram dezoito proteínas entre 19,0 e 170,0 Kda das quais, mostraram-se reativas com soro de pacientes portadores de leishmaniose, as de 63,0; 100,0; 123,0 e 138,0 Kda. Altas taxas de reação cruzada foram detectadas entre o antígeno de *Leishmania amazonensis* e soros de pacientes com Doença de Chagas. A glicoproteína de 63,0 Kda, considerada uma importante proteína de superfície e comum a todas as espécies de *Leishmania* em ambas as formas, amastigota e promastigota, (HANDMANN e GODING, 1985; RUSSEL e WILHELM, 1986; FROMMEL et al. 1990) apesar de ser considerada específica para a espécie, reagiu também contra soros de pacientes com Paracoccidioidomicose.

Dos grupos clínicos analisados por *Western blotting*, as proteínas de: 218,8; 61,6; 56; 53,7 e 17,7 Kda mostraram especificidade para o antígeno de *Leishmania braziliensis*. As proteínas de 89,1; 69,1; 46,7; 40,7 e 23,9 Kda mostraram-se específicas para o antígeno de *Leishmania amazonensis*. Essas proteínas específicas poderiam ser isoladas e analisadas contra anti-soro específico para avaliação da sua reatividade.

Seis soros de pacientes cujo diagnóstico para LTA não se confirmou por exame parasitológico, mas foram reagentes para IFI e/ou ensaio imunoenzimático nos antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, foram submetidos à análise por *Western blotting* (dados não mostrados). Para o antígeno de *L. braziliensis*, as seis amostras reagiram contra as proteínas de 177,8 e 169,8 Kda, quatro reagiram também para a proteína de 112,0 Kda e duas para a proteína de 61,6 Kda. Duas amostras não foram reagentes para o ensaio imunoenzimático e *Western blotting* para o antígeno de *L. amazonensis*. As demais reagiram combinando algumas das proteínas prevalentes para este antígeno: 141,2 (02); 138,0 (02); 114,8 (02); 112,2 (02); 109,6 (02); 104,7 (02); 89,1 (01); 83,3 (03); 79,4 Kda (03). As proteínas de 75,8; 74,1; 33,9; 33,1; 30,9 e 29,5 Kda combinadas apareceram nas quatro amostras reagentes e duas ainda apresentaram reação contra a proteína de 23,9 Kda. As proteínas reveladas no antígeno de *L. braziliensis* são as mesmas que foram reveladas

com maior frequência no grupo de portadores de LTA e aquelas reveladas no soro de portadores assintomáticos (comunicantes) (Tabela 08). Algumas proteínas reveladas no soro de pessoas sem leishmaniose vivendo em regiões de transmissão, sugerem que algumas proteínas de maior peso molecular possam estar relacionadas ao prévio contato com o parasito (*MARY* et al., 1992).

Finalmente, a análise comparativa das metodologias adotadas no presente estudo, nos mostra o que muitos pesquisadores vêm reforçando há vários anos em termos de diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana: a importância do diagnóstico diferencial; a adoção do diagnóstico parasitológico como padrão ouro (quando possível); a associação de metodologias e a busca por métodos mais sensíveis, específicos e, sobretudo factíveis a Rede de Saúde Pública.

## 5. CONCLUSÃO

A análise comparativa dos métodos diagnósticos usados no presente estudo nos permitiu concluir que:

1. As técnicas parasitológicas de diagnóstico (esfregaço/*in print* e isolamento por cultivo) mostraram-se igualmente sensíveis (70,1%) e quando associadas, há um aumento de sensibilidade (79,3%).
2. Na produção de antígenos (figurado e solúvel) para diagnóstico da Leishmaniose, a escolha da espécie, o tempo de cultivo, o meio de cultivo, a taxa de inóculo, pode garantir a reprodutibilidade dos testes e qualidade nos resultados.
3. No diagnóstico sorológico da Leishmaniose, o antígeno homólogo proporciona maior reatividade que o antígeno heterólogo, pois este apresentou altas taxas de reações cruzadas com as outras patologias.
4. O método de Imunofluorescência Indireta apresentou sensibilidade 91,6% com antígeno de *Leishmania braziliensis* e 75,0% contra o antígeno de *Leishmania amazonensis*. A especificidade foi de (100,0%) para os dois antígenos;
5. No ensaio imunoenzimático, o antígeno de *L. braziliensis* mostrou-se mais sensível com 95,0% de reatividade nos soros de pacientes com diagnóstico confirmado parasitologicamente, contra 71,7% para o antígeno de *L. amazonensis*. A especificidade na técnica para os antígenos foi de 92,3% contra 84,6% respectivamente.
6. A análise de *Western blotting*, conferiu 100,0% de sensibilidade (Grupo II) e mostrou-se útil na determinação de portadores assintomáticos bem como para estabelecer diagnóstico diferencial entre a LTA e outras doenças freqüentemente reportadas como responsáveis por reações cruzadas.
7. Das proteínas de *Leishmania braziliensis* que foram reconhecidas pelos grupos clínicos analisados, cinco foram reconhecidas exclusivamente por pacientes com LTA: 218,8; 61,6; 56; 53,7 e 17,4 Kda (freqüência de 8,3; 30,0; 1,7; 3,3 e 10,0% respectivamente). A proteína de 61,6 Kda foi reconhecida também por dois soros de pacientes que

não tiveram o diagnóstico para leishmaniose, comprovado por exame parasitológico, mas que foram reativos nas outras técnicas sorológicas.

8. As proteínas de *L. amazonensis* exclusivamente reconhecidas na análise sorológica de pacientes portadores de leishmaniose: 89,1; 69,1; 46,7; 40,7 e 23,9 Kda com prevalência de 25,0; 10,0; 40,0; 6,6 e 6,6% respectivamente, duas foram reconhecidas por pacientes com clínica mas sem a comprovação da doença por exame parasitológico: 89,1 Kda (um paciente) e 23,9 Kda (quatro pacientes).

9. Os dados obtidos ressaltam a importância de conhecer o agente etiológico causador da doença, pois de posse do conhecimento da espécie circulante é possível fazer uso de antígeno homólogo aumentando a sensibilidade do diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana.

10. Poder-se-ia propor para a Secretaria da Saúde do Paraná, a produção e validação de métodos diagnósticos visando melhorar os resultados finais, com aumento de sensibilidade e especificidade das técnicas.

11. Como perspectivas futuras, a implantação do ensaio imunoenzimático como um segundo método para o diagnóstico da LTA nos laboratórios da Rede Pública de Saúde, associado ao método de Imunofluorescência indireta e ainda, avançar nas pesquisas com proteínas específicas para o diagnóstico (intradermoreação ou ensaio imunoenzimático com antígeno homólogo), visando proporcionar agilidade nos resultados dos testes e segurança no diagnóstico.

## REFERÊNCIAS

AGWALE, S.M.; DUCHLINSKA, D.D.; GRIMALDI Jr, G. Response to heterologous Leishmanins in Cutaneous Leishmaniasis in Nigeria – Discovery of a New Focus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 1998; v.93, n.1, pp. 23-27.

AISA, J.M.; CASTILLEJO, S.; GALLEGO, M.; FISA, R. RIERA, M.C.; COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J. ; PORTUS, M. Diagnostic Potential of Western Blot Analysis of Sera from Dogs with Leishmaniasis in Endemic Areas and Significance of the Pattern. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 1998; v.58 n.2, pp. 154-159.

AKUFFO, H.; DARCE, M.; MAASHO, K.; BERHAN, T.Y. In vivo evaluation of immune response in leishmaniasis: the use of cross-species leishmanin preparations for skin testing. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 1995; v.58 n.1, pp. 16-22.

ANDRADE, A.S. de; SANTORO, M.M.; MELO, M.N.; MARES-GUIA, M. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and enzymatic characterization of a soluble serine oligopeptidase from promastigotes. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, 1998; v.89, n.2, pp. 153-160.

ATTA, A.M.; COLOSSI, R.; SOUZA-ATTA, M.L.B.; JERONIMO, S.M.B. NASCIMENTO, M.D.S.B. BEZERRA, G.F. ORGE, G.; CARVALHO, E.M. Antileishmanial IgG and IgE Antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2004; v.99, n.5, pp. 525-530.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR, G. MOMEN, H. McMAHON-PRATT, D.; de JESUS, A.R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E.; JOHNSON JR, W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 1991; v.44, n.5, pp. 536-546.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; SCHUBACH, T.M.P.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SALGUEIRO, M.M.; MOUTA-CONFORT, E.; REIS, R.S.; MADEIRA, M.F.; CUZZI, T.; QUINTELLA, L.P.; PASSOS, J.P.S.P.; CONCEIÇÃO, M.J.; MARZOCHI, M.C.A. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Acta Tropica**, Stockholm, 2005, v.93, n.1, pp.41-47.

**Boletim Eletrônico Epidemiológico. FUNASA**, Ano 1 nº. 2: 10/04/2002  
[www.funasa.gov.br/boletimepidemiologico](http://www.funasa.gov.br/boletimepidemiologico) .

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Georgia 1976; v. 72, pp.248-254.

Brasil. Ministério da Saúde. **Normas Técnicas para Diagnóstico, Tratamento e Controle da LTA.** Port.1402/MS de 14/08/91.

BRAZ, R.F.S.; NASCIMENTO, E.T.; MARTINS, D.R.A.; WILSON, M.E.PEARSON, R.D.; REED, S.G.; JERONIMO, S.M.B. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American Visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 2002; v.67, n.4, pp. 344-348.

BRITO, M.E.; MENDONÇA, M.G.; GOMES, Y.M.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G.C. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Portland, 2000; v.7, n.2, pp.318-321.

BRITO, M.E.; MENDONÇA, M.G.; GOMES, Y.M.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G.C. Dynamics of the antibody responses in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 2001; v.95, n.2, p.203-206.

BRYCESON, A.D.M. Clinical variations associated with various taxa of *Leishmania*  
In\_ *Leishmania*: Taxonomie et phylogenèse. Applications éco-épidémiologiques. **IMEEE**, Montpellier, 1986, pp. 221-228.

BOLT, M.W. and MAHONEY, P.A. High efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate- Polyacrilamide gel Electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, Georgia, 1997; v.247, pp.185-192.

CAMARGO, M.E. and REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies: A simple inhibition procedure to ensure specific results. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 1969; v.18, n.4, pp. 500-505.

CARDOSO, A. S.; DA SILVA, J.C.V.; DA COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; LIU, I.A.W.; FUJIWARA, R.T.; NASCIMENTO, E. Identification and Purification of Immunogenic proteins from nonliving promastigote Polivalent *Leishmania* Vaccine (Leishvacin®). **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, 2003; v.36, n.2, pp.193-199.

CASTRO, E.A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de Leishmaniose Tegumentar, notificados na Região Norte do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, 2002; v.35, n.5, p.445-452.

CASTRO E.A. de Aspectos epidemiológicos e Parasitológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana em duas Regiões do Estado do Paraná e o Papel do cão na Manutenção do Ciclo de *Leishmania*. **TESE**, Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2001.

CHIARI, C.A.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A. Reação de Imunofluorescência Indireta no controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 1973; v.15, pp.298-303.

CHIARI, C.A.; MAGALHÃES, PA; MAYRINK, W. Pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana apresentando lesões cutâneas recentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 1973; v.15, pp. 304-309.

CHILLER, T.M.; SAMUDIO, M.A., and ZOULEK, G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chaga's disease and leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 1990; v.43, n.6, pp. 650-656.

CUBA-CUBA, C.A. Diagnostico Parasitologico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. **Revista de Medicina Experimental**, Lima, 2000, v.17, pp.1-4.

CUBA-CUBA, C.A.; OGUNKOLADE, W.; HOWARD, M.K.; MILES, M.M. Immunological selection for *Leishmania (V) braziliensis* antigens. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, 2001; v.95, n.5, pp.473-483.

DA COSTA, J.M.C.; NEOGY, A.B.; VOULDOUKIS, I.; SILVA, M.L.S.; GENTILINI, M.; MONJOUR, L. Antigenic components of partially purified antigens of *Leishmania donovani infantum* recognized by sera from dogs asymptomatic or active visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 1996; v.55, n.5, pp. 511-515.

DE ANDRADE, A.S.; SANTORO, M.M.; DE MELO, M.N.; MARES-GUIA, M. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and enzymatic characterization of a soluble serine oligopeptidase from promastigotes. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, 1998; v.9, n.2, pp.153-160.

DEDET, J.P.; PRATLONG, F.; LANOTTE, G.; RAVEL, C. The Parasite. **Clinics in Dermatology**, San Diego, 1999; v.17, pp.261-268.

DELGADO, O.; GUEVARA, S.S.; BELFORT, E.; RAMIREZ, J.L. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and Polymerase Chain Reaction **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 1996; v.55, n.3, pp. 267-272.

DIAS, M.; MAYRINK, W.; DEANE, L.; COSTA, C.; MAGALHÃES, P.; MELO, M.; BATISTA, S. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I - Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais.



**Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 1977; v.19, p.403-410.

DYE, C.; VIDOR, E.; DARABIAN, P. Serological diagnosis of Leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiological Infectology**, Riga, 1993; v.103, p. 647-656.

EDRISSIAN, G.H. and DARABIAN, P. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the ser-diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 1979; v.73, p.289-292.

ENGVALL, E. and PERLAMANN, P. Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA. **Journal of Immunology**, Bethesda, 1972; v.109, p.129-135.

FABER, W.R.; OSKAM, L.; VAN GOOL, T.; KROON, N.C.M.; KNEGT-JUNK, K.J.; HOFWEGEN, H.; van der WAL, A.C.; KAGER, P.A. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of American Academy Dermatology**, Worcester, 2003; v.49, n.1, pp. 70-74.

FIGUEIREDO, Y.P.; da COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; ARAÚJO, F.G.; DIAS, M.; MELO, M.N.; MAGALHÃES, P.; WILLIAMS, P.; BATISTA, S.M.; COELHO, M.V. Nutrição e metabolismo de formas de cultura de *Leishmania*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 1976; v. 18, n.5, pp. 306-314.

FROMMEL, T.O.; BUTTON, L.L.; FUJIKURA, Y.; McMASTER, W.R. The major surface glycoprotein (GP 63) is present in both life stages of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Portland, 1990; v.38, pp.25-32.

Fundação Nacional de Saúde. Manual de **Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2000.

FURTADO, T. and PELLEGRINO, J. Intradermal test in American leishmaniasis with a polysaccharide fraction isolated from *Leishmania braziliensis*. **The Journal of Investigative Dermatology**, Thomson, 1956; v.27, n.53, pp.54-59.

GONÇALVES, C.C.M.; REICHE, E.M.V.; ABREU-FILHO, B.A.; SILVEIRA, T.G.V.; FELIZARDO, T.C.; MAIA, K.R.; COSTACURTA, R.; PADOVESI, E.J.; DIAS FILHO, B.P.; JANKEVICIUS, S.I.; JANKEVICIUS, J.V. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a *Western blot* for diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 2002; v.66, n.1, pp. 91-102.

GRAHAM JR., R.C.; LUNDHOLM, U.; KARNOVSKY, M.J. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, 1965; v.13, pp.150-152.

GUIMARÃES, M.C. Exames de Laboratório: Sensibilidade, Especificidade, Valor preditivo positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, 1985; v. 18, n.2, pp.117-120.



GUIMARÃES, M.C., COUTINHO, S.G.; ANTUNES, C.M.F. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, 1987; v. 20, n.1, pp.55-58.

HOMMEL, M., PETERS, W., RANQUE, J., QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, 1978; v.72, pp.213-218.

ILG, T.; HANDMAN, E.; NG, K.; STIERHOF, Y-K.; BACIC, A. Mucin-like Proteophosphoglycans from the Protozoan Parasite *Leishmania*. Minireview. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, Kanagawa, 1999; v.58, n.11, pp. 57-71.

JAFFE, C.L.; SHOR, R.; TRAU, H.; PASSWELL, J.H. Parasite antigens recognized by patients with cutaneous leishmaniasis. **Clinical Experimental Immunology**, London, 1990; v.80, pp.77-82.

KAPLOW, L.S. Substitute for benzidine in Myeloperoxidase stains. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, 1974; v. 63, p.451.

KILLIK-KENDRICK, R.; PETERS, W. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987.

KUTNER, S.; PELLERIN, P.; BRENIERE, S.F.; DESJEUX, P.; DEDET, J.P. Antigenic specificity of the 72-kilodalton major surface glycoprotein of *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Journal of Clinical Microbiology** Stanford, 1991, v.29, n.3, pp.595-599.

LA PLACA, M.; PAMPIGLIONE, S.; BORGATTI, M.; ZERBINI, M. Complement fixation and intradermal skin test with partially *Leishmania donovani* **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 1999; v.69, n.4, pp. 396-398.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, London, 1970; v.227, p. 680-685.

LAINSON, R. and SHAW, J.J. **Evolution, classification and geographical distribution**. In: \_PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 1-120.

LAUNOIS, P.; SWIHART, K.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MILON, G.; LOUIS, J. **Polarized Response of Murine T Cell Subsets to *Leishmania* Infection**. In: **Host Response to Intracellular Pathogens**. Austin-Texas Ed. R.G.Landes Company, 1997.

LEGRAND, D.; DESJEUX, P.; Le PONT, F.; BRENIERE, S.F.; LAMESRE, J.L.; SANTORO, F.; CAPRON, A. Identification of a major 72 kilodalton surface antigen in twelve isolates of *Leishmania braziliensis braziliensis* **Molecular and Biochemical Parasitology**, Portland, 1987, v.24, pp.117-124.

LOPEZ, S.P.A.; RESTREPO, S.M.R. Revisión de Tema: Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania sp.* **IATREIA**, Antioquia, 2000; v.13, n.3, p. 167-178.

LUZ, E., MEMBRIVE, N., CASTRO, E.A., DEREURE, J., PRATLONG, F., DEDET, J. A., PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V., *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, 2000; v. 94, p. 623-631.

MALCHIODI, E.L.; CHIARAMONTE, M.G.; TARANTO, N.J.; ZWIRNER, N.W.; MARGINI, R.A. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clinical Experimental Immunology**, London, 1994; v.97, pp.417-423.

MARY, C.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S.; QUILICI, M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: Potencial of 14-KD and 16-KD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. **American Journal of Tropical Medicine and Higiene**, Stanford, 1992; v.47, n.6, pp.764-771.

MARTY, P.; LEVIEVE, A.; QUARANTA, J.F.; RAHAL, A.; GARI-TOUSSAINT, M.; FICHOUX, Y. Use of the leishmanin skin test and Western blot análisis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas: experience in a highly endemic focus in Alpes Maritimes (France). **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Higiene**, London, 1994; v.88, pp. 658-659.

MASUDA, A; do NASCIMENTO, S.F.; GUERRA, C.S.; PARANHOS, G.S. FERREIRA, A W. Analysis of the specificity of human antibodies to antigens of *Leishmania braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 1989; v.31, n.4, pp.228-234.

MATOSSIAN, R.; KURBAN, A.; MALAK, J. Circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis: their detection by immunofluorescence. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 1975; v. 69, n.5 & 6, pp.450-452.

MAYRINK, W.; DA COSTA, C.AMAGALHÃES, P.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; OLIVEIRA LIMA, A; MICHALICK, M.M.; WILLIANS, P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 1979; v. 73, p.385.

MENDONÇA, S.C.F.; RUSSEL, D.G.; COUTINHO, S.G. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp63). **Clinical Experimental Immunology**, London, 1991; v.83, pp.472-478.

MENGISTU, G.; AKUFFO, H.; FEHNIGER, T.E.; NEGESE, Y.; NILSEN, R. Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 1992; v. 86, n.02, pp.154-157.

MONROY-OSTRIA, A.; SOSA-CABRERA, T.RIVAS-SANCHES, B.; RUIZ-TUYU, R.; MENDOZA-GONZALES, A.R.; FAVILA-CASTILLO, L. Seroepidemiological Studies of Cutaneous Leishmaniasis in the Campeche State of México. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 1997; v.92, n.1, pp. 21-26.

MUSKUS, C.; SEGURA, I.; ODDONE, R.; TURCO, S.J. LEIBY, D.A.; TORO, L.; ROBLEDO, S.; SARAIVA, N.G. Carbohydrate and LPG expression in *Leishmania Viannia* subgenus. **International Journal of Parasitology**, Camberra, 1997; v.83, n.4, pp.671-678.

OMS. *Lutte contre les leishmanioses. Serie de repports techniques*. OMS, Geneve, 1990; v.793 , p.176 .

PASSOS, V.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: caracterização clínica, evolutiva, laboratorial e epidemiológica (Belo Horizonte, 1989-95) **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, 1999; v.32, n.2, pp. 207-209.

PIARROUX, R. & MINODIER, P. Les Leishmanioses Tegumentaires: quoi de neuf en 2000? **Médecine Tropicale**, Bordeaux, 2000; v. 60, n.1, pp.19-24.

REED, S.G. Diagnosis in Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, San Diego, 1996 ; v.14, pp. 471-478.

REED, S.G. ; BADARO, R. ; CHERI LLOYD, R.M. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. **The Journal of Immunology**, Bethesda, 1987; v.138, n.5, pp.1596-1601.

REZAI, H.R.; BEHFOROZ, N.; AMIRHAKIMI, G.H. ; KOHANTEB, J. Immunofluorescence and counter immunoelectrophoresis in the diagnosis of Kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 1977; v. 71, n.2, pp.149-151.

RIDLEY, D.S.; MARSDEN, P.D.; CUBA, C.C.; BARRETO, A.C. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 1980; v. 74, n.4, pp.508-514.

ROMERO, G.A.S.; ORGE-ORGE, M.G.; GUERRA, M.V.F.; PAES, M.G.; MACÊDO, V.O.; CARVALHO, E.M. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Tropica**, Stockholm, 2005, v.93, pp.49-56.

ROSS E. Notes on the bodies recently described by Leishmann and Donovan. **Britannic Medicine Journal**, London, 1903; v.2, pp.1261-1262.

**Leishmaniose Tegumentar Americana.**  
[www.saude.pr.gov.br/Agravos/Leishmaniose](http://www.saude.pr.gov.br/Agravos/Leishmaniose) 20/07/2001.

SALOTRA, D.; RAINA, A.; NEGI, N.S. Immunoblot analysis of the antibody response to antigens of *Leishmania donovani* in India Kala-a-zar. **British Journal of Biomedical Science**, London, 1999; v.56, pp.263-267.

SHAW, J.J. and LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations on intradermal reactions to different Trypanosomatids antigens of patients from Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 1975; v.69, n.3, pp.323-335.

SILVEIRA, T.G.V. TEODORO, U., LONARDONI, M.V.C.; GUILHERME, A.L.F.; TOLEDO, M.J.O.; RAMOS, M.; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; SPINOZA, R.P.; BARBOSA, O.C. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 1996; v.12, n.2, pp. 141-147.

SILVEIRA, T.G.V., ARRAES, S.M.A.A., BERTOLINI, D.A., TEODORO, U., LONARDONI, M.V.C.; ROBERTO, A.C.B.S., Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, 1999; v.32, pp. 413-423.

THIERRY, J.; BOREL, E.; COURRIER, P.L.; COURTOIS, D.; MOJON, M. Leishmaniose cutanee sud-americaine diagnostic parasitologique et serologique par immunofluorescence indirecte (IFI) et enzyme-linked immuno assay (ELISA): À propos de 94 cas. **Medicine Tropicale**, Bordeaux, 1991; v.51, n.1, pp.43-48.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LANNOTE, G.; RIOUX, J.A ; PRATLONG, F.; MATINI-DUMAS, A; SERRES, E. Phylogenetic taxonomy of the New World *Leishmania*. **Annals de Parasitologie Humaine et Comparée**, 1993; v. 68, pp.104-106.

THOMAZ-SOCCOL V, CASTRO EA, LUZ E, DEREURE J, PRATLONG F, DEDET JA, *Leishmania braziliensis*: Biochemical Characterisation by Isoenzyme Electrophoresis in two regions of Paraná State, Brazil. *In: Abstracts of International Conference on New Horizons in Biotechnology*, Trivandrum, India, 2001; p. 225.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from Polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedins of National Academi Science of USA**, 1979; v.76, p.4350-4354.

TURCO. S.J.; SPATH, G.F.; BEVERLY, S.M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, Oxford, 2001; v.17, n.5.

WILLIAMS, K.M.; SACCI, J.B.; ANTHONY, R.L. Characterization and quantitation of membrane antigens of New World *Leishmania* species by using monoclonal antibodies in Western blot and flow microfluorometric assays. **Journal of Protozoology**, Kobe, 1986; v.33, n.4, pp.490-497.

**ANEXO 1****PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO:**

## a) Meio NNN (Novy-McNeal-Nicolle):

Bacto agar	6,25 g
NaCl	3,75 g
Água destilada	1000mL
Sangue de coelho	10 %

Preparo: Diluir o sal e o agar em água destilada e aquecer em banho-maria, manter em ebulição durante cinco minutos, sob agitação. Distribuir em frascos erlenmeyer, fechados e autoclavar por 15 minutos a 121 °C. Em cabine de fluxo laminar adicionar o sangue de coelho (10%) ao meio resfriado a 50°C, homogeneizar. Deixar solidificar em temperatura ambiente por duas horas.

O sangue de coelho é obtido por punção cardíaca e colocado em frasco erlenmeyer cotendo citrato de sódio a 10% (como conservante e anticoagulante).

## b) Meio CCS (Coração-Cérebro-Sangue):

Brain Heart Infusion Agar	52 g
Água destilada	1000mL
Sangue de coelho	10%

Preparo: Em um recipiente de vidro o meio seco é diluído em água destilada e levado ao fogo em banho-maria. Os passos seguintes são idênticos aos descritos no preparo do meio NNN.

## c) Solução tampão fosfato (PBS-Phosphate Buffered Solution)

NaCl	8,77g
Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1,92g
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,39g
Água destilada	1000mL.

Preparo: Hidratar os sais e homogeneizar a solução em agitador magnético até a sua completa dissolução. Ajustar o pH para 7,2 e esterilizar por filtração.

## ANEXO 2

### PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE ANTÍGENO PARA IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA

O preparo dos antígenos seguiu os protocolos conforme Castro 2001, com adaptações.

Formas promastigota de *L. braziliensis* foram cultivadas a 24°C por cinco dias em meio nutritivo CCS.

- a) Recolher a fase líquida do cultivo e filtrar em gaze estéril lavando com solução salina fisiológica a 0,85%, para eliminar restos de meio. Centrifugar por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C e 300 g.
- b) Desprezar o sobrenadante e lavar com solução salina (sucessivamente 0,3% e 0,85%) e centrifugações com rotações crescentes (350 e 530 g.) até a lise das hemáceas e remoção da hemoglobina de coelho.
- c) Lavar duas vezes com Solução PBS pH 7,2 e centrifugar a 750 g em centrífuga refrigerada por 20 minutos.
- d) Acrescentar ao sedimento, 10 mL de PBS pH 7,2.

Para inativação dos protozoários e como forma de conservação, a ressuspensão foi mergulhada em banho-maria a 55°C por oito minutos.

Adaptação baseada em Pessoa, 1988.

- e) Contagem de promastigotas:
  - De uma alíquota do concentrado, foi preparada uma diluição 1/10 com solução PBS pH 7,2. Em lâmina reticulada especial para contagem de partículas (Câmara de Thoma), depositou-se 10 µL da diluição entre lâmina e lamínula e então contada em microscópio ótico com aumento de 400 vezes.
  - Para a obtenção do número de parasitas por mililitro de antígeno, foram contadas as 16 fileiras maiores do retículo, calculada a média por fileira e esta multiplicada pelas medidas da lâmina (250 X 103 mm) e pelo fator de diluição (10). A diluição final foi ajustada de modo a obter-se um número ideal de promastigotas, em torno de  $3 \times 10^6$ /mL.

**ANEXO 3****PROTOCOLO DE PREPARO DOS ANTÍGENOS DE *Leishmania* PARA ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO**

- a) Cultivar as formas promastigota de *Leishmania* em garrafas de Roux com meio CCS e solução salina fisiológica esterilizada por seis dias a 24°C.
- b) Recolher o sobrenadante das garrafas e remover as formas promastigotas, filtrando conteúdo líquido. A seguir, lavar com solução salina fisiológica e centrifugar a 4°C por 15 minutos a 750 g por duas vezes.
- c) Armazenar o sedimento obtido de *Leishmania* em freezer a -20°C até o preparo final do antígeno.
- d) Obtido estoque satisfatório, descongelar as formas promastigota a 4°C.
- e) Centrifugar a 750 g em centrífuga refrigerada por 15 minutos.
- f) Ressuspender o sedimento com água destilada esterilizada num volume igual à metade do volume desse sedimento.
- g) Romper as células por congelamento súbito, imergindo os tubos em nitrogênio líquido (por 5 minutos) e imediato descongelamento em estufa a 37°C. O Repetir o processo seis vezes.
- h) Mantendo os antígenos conservados em banho de gelo aplicar a ação de ultra-som 5.0 MHz efetuando seis séries de 30 segundos com intervalos de 1 minuto.
- i) Centrifugar o produto resultante por 60 minutos em ultra centrífuga, a 4°C e 14.000 g.
- j) Recuperar o sobrenadante, filtrar em sistema esterilizante (membrana 0,22μ) e após a dosagem de proteínas alicotar em volumes de 500μL.
- k) Armazenar em temperatura de - 20°C.



## ANEXO 4

### DOSAGEM PROTÉICA PELO MÉTODO DE BRADFORD

Foi utilizado reagente de Bradford comercial, Bioagency.

#### Procedimento

1. A solução concentrada do reagente de Bradford foi diluída em água destilada e filtrada em filtro tipo Whatmann nº1, conforme indicação do fabricante.
2. Preparadas seis diluições da solução padrão de Soroalbumina Bovina (BSA), de concentração conhecida (1mg/mL).
3. Adição da água destilada em cada tubo e a seguir o padrão BSA e as amostras
4. Homogeneizar em agitador tipo vortex
5. Adicionar o reagente diluído, homogeneizar em agitador tipo vortex.
6. Incubar por cinco minutos em temperatura ambiente
7. Proceder à leitura em espectrofotômetro em 595 nm, imediatamente.
8. Anotar as absorbâncias em protocolo.
9. Obter a curva de concentração e calcular as concentrações dos antígenos

Quadro 1 - Dosagem protéica segundo o Método de Bradford

TUBOS	Ag.( $\mu$ l)	PADRÃO( $\mu$ g/m)	H <sub>2</sub> O( $\mu$ L)	REAGENTE	ABSORBÂNCIA
1 branco	-	-	500	5mL	0.0
2	-	10	490	5mL	0,036
3	-	10	490	5mL	0,040
4	-	20	480	5mL	0,130
5	-	20	480	5mL	0,129
6	-	40	460	5mL	0,189
7	-	40	460	5mL	0,199
8	-	60	440	5mL	0,263
9	-	60	440	5mL	0,260
10	-	80	420	5mL	0,292
11	-	80	420	5mL	0,299
12	-	100	400	5mL	0,343
13	-	100	400	5mL	0,342
14 <i>L.a.</i>	40	-	460	5mL	0,112
15 <i>L.a.</i>	40	-	460	5mL	0,120
16 <i>L.a.</i>	40	-	460	5mL	0,132
17 <i>L.b.</i>	40	-	460	5mL	0,080
18 <i>L.b.</i>	40	-	460	5mL	0,071
19 <i>L.b.</i>	40	-	460	5mL	0,075

## ANEXO 5

### PROTOCOLO DO TESTE DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* NO SORO DE PACIENTES

Preparo das lâminas:

Sensibilizar a lâmina com antígeno (20 $\mu$ L/*spot*);

Deixar sedimentar por 15 min;

Armazenar a lâmina em estufa a 37°C por 1 a 2h;

Guardar as lâminas prontas em caixas de vidro apropriadas e envolvê-las em papel de alumínio. Armazenar em freezer (-20°C) até sua utilização.

Procedimento:

- a) Retirar as lâminas do freezer; e secar com auxílio de ventilador;
- b) Diluir os soros em solução PBS pH 7,2;
- c) Depositar 20 $\mu$ L de cada diluição dos soros, e dos controles, na lâmina;
- d) Colocar a lâmina em câmara úmida e incubar a 37°C por 30 min;
- e) Depositar as lâminas, em posição vertical, em banho de PBS por 10 min;
- f) Enxaguar com água destilada;
- g) Secar com auxílio de ventilador;
- h) Diluir o conjugado em solução PBS pH 7,2;
- i) Colocar 20 $\mu$ L do conjugado em cada "*spot*";
- j) Repetir os passos d, e, f, g;
- k) Depositar solução de glicerina 10% entre as fileiras da lâmina;
- l) Cobrir com lamínula;

Leitura em microscópio para imunofluorescência fotomicroscópio (lâmpada HBO 200 e filtro BG 12) em aumento de 400x.

## ANEXO 6

### PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA TÉCNICA DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Preparo dos reativos:

a) Coating Buffer (tampão carbonato 0,005M)

Solução A:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,1 g
água deionizada	200 mL

Solução B:

Na HCO <sub>3</sub>	4,2 g
água deionizada	1000 mL
Acertar pH para 9,6 adicionando a solução A em B	

b) Solução de Lavagem

NaCl	9 g
Tween 20	0,5 mL
água destilada	1000 mL

c) Solução de Bloqueio da placa

Caseína 2% em PBS\* (dissolver com aquecimento)  
0,05% de Tween 20

d) PBS 0,05M com 0,15M de NaCl, pH 7,4\*

Solução A:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	7,1 g
NaCl	8,8 g
água destilada	1000 mL

Solução B:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 g
NaCl	1,88 g
água destilada	200 mL

Acertar o pH para 7,4 adicionando a solução B em A.

e) Tampão de incubação (à partir da solução de Bloqueio)

solução de bloqueio	62,5 mL
Tween 20	0,25 mL
PBS pH 7,4	500 mL

Alicotar em volumes de 10 mL e congelar.

f) Tampão citrato pH 5,0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (ou 13,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	7,10 g
ácido cítrico	5,19 g
água destilada	1000 mL

h) Solução de ácido sulfúrico a 2%

$\text{H}_2\text{SO}_4$	19 mL
água destilada	41 mL

## ANEXO 7

### PROTOCOLO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENO DE *Leishmania* NO SORO DE PACIENTES

Procedimento:

a) Sensibilização da placa:

- ✓ Aplicar 100 µL do antígeno/pocinho na diluição padronizada;
- ✓ Incubar em estufa a 37°C por uma hora. (Este procedimento é uma adaptação do protocolo adotado por constatarmos uma melhora significativa na sensibilização da placa).
- ✓ Em seguida, incubação por 12 horas em geladeira.

b) Bloqueio:

- ✓ Lavar a placa duas vezes com solução de lavagem para remoção do antígeno não fixado.
- ✓ Aplicar a solução de bloqueio em toda a placa
- ✓ Incubar por uma hora a 37°C;
- ✓ Lavar duas vezes com a solução de lavagem para retirada da proteína que não fixou.

c) Adição dos soros:

- ✓ As amostras de soros são descongeladas e diluídas em solução tampão de incubação à temperatura ambiente;
- ✓ Adicionar à placa 100µL, conforme padronização;
- ✓ Incubar em estufa a 37°C por uma hora.
- ✓ Retirada da estufa, lavar a placa seis vezes em solução de lavagem.

d) Adição do Conjugado:

- ✓ Diluir o conjugado em solução tampão de incubação em temperatura ambiente.
- ✓ Adicionar em toda a placa (exceto a coluna controle),

- ✓ Levar à estufa a 37°C por uma hora.
- ✓ Em seguida, lavar seis vezes com a solução de lavagem para remoção das partículas não ligadas.

e) Substrato:

- ✓ As pastilhas de OPD são diluídas em tampão citrato, no momento do uso e ao abrigo da luz.
- ✓ Em seguida adiciona-se 4µL de peróxido de hidrogênio a 30%.
- ✓ O substrato é aplicado na placa toda;
- ✓ Incubar em estufa a 25°C, ao abrigo da luz por 25 minutos.

f) Interrupção da reação:

- ✓ Adicionar cuidadosamente 50 µL/pocinho de uma solução de ácido sulfúrico a 2%, em toda a placa.

h) Leitura

- ✓ A placa é imediatamente levada ao Leitor de ELISA, onde é feita a leitura do espectro de cor, com ajuste para comprimento de onda de 492 nm.
- ✓ Os resultados são anotados em protocolo para posterior análise.

**ANEXO 8****PREPARO DE REAGENTES UTILIZADOS NA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRIOLAMIDA-SDS**

Preparo dos reagentes:

a) Tampão de corrida pH 8,3:

Tris	3,0g
Glicina	14,4g
SDS	1,0g

Completar o volume para 1000 mL. Ajustar o pH da solução com ácido clorídrico. Armazenar a 4 °C.

b) Tampão de amostra com Mercaptoetanol:

solução Tris pH 6,8	2,5 mL
solução SDS 10%	5,0 mL
Glicerol	2,0 mL
EDTA 0,1M	0,1 mL
Azul de Bromofenol	0,2 mg

Completar o volume para 20 mL com água destilada. No momento do uso, adicionar 5µL de Mercaptoetanol em cada 195µL do tampão de amostra.

c) Solução corante:

0,25% (m/v) de Coomasie Brilliant Blue R 250	
Metanol	50 mL
ácido acético	10 mL

Completar o volume para 100mL com água destilada. Armazenar protegido da luz.

d) Solução descorante/conservante:

40 % metanol
10 % ácido acético
50% água destilada

Soluções para o preparo do gel:

e) Solução A (usar luvas e máscara para o preparo desta solução):

Acrilamida	30,0g
------------	-------

Bisacrilamida	0,8 g
---------------	-------

Completar o volume para 100mL de água destilada. Filtrar e guardar em frasco escuro a 4 °C.

f) Solução B (Tampão do gel de corrida):

Tris	18,15g
------	--------

Ajustar o pH para 8,8 com HCl a 50% e completar o volume para 100 mL com água destilada. A solução pode ser armazenada por até duas semanas a 4 °C.

g) Solução C (SDS 10%):

SDS	5,0 g
-----	-------

Completar o volume para 100 ml de água destilada. Armazenar em temperatura ambiente. Pode precipitar em baixas temperaturas. Neste caso, aquecer a 25 °C.

h) Solução D (Tampão do gel de Empilhamento – Spacer)

Tris	3,0 g
------	-------

Completar o volume com água destilada para 50 ml e ajustar o pH para 6,8 com HCl. A solução pode ser armazenada por até duas semanas a 4 °C.

i) Persulfato de amônia a 10%

Persulfato de amônio	0,5g
----------------------	------

Completar o volume para cinco ml de água destilada. Deve ser preparado no dia do uso ou alicotado e conservado a -20 °C.



## ANEXO 9

### PROTOCOLO DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Procedimento para a montagem do sistema:

#### a) Montagem das placas/molde

- Limpar cuidadosamente as placas de vidro em solução álcool-éter (v/v) e secá-las bem.
- Montar as placas numa superfície limpa e seca. Colocar o vidro maior numa superfície imóvel, distribuir os espaçadores de um mm de espessura ao longo das extremidades da placa;
- Colocar sobre estes, a placa menor;
- Prender as placas com presilhas antes da vedação com fita de silicone;
- Posicionar verticalmente o sistema de placas e nivelar o suporte.

#### b) Preparo do gel:

- Gel de separação a 15% (o gel deve ser preparado na ordem apresentada):

Água destilada	4,6 mL.
Solução A	10,0 mL.
Solução B	5,0 mL.
Solução C	0,2 mL.
Persulfato de amônio 10%	0,2 mL.
TEMED	0,016 mL.

- Aplicar o gel com auxílio de micropipeta (7,2 mL), no vão entre as duas placas de vidro.
- Sobre o gel devem ser adicionados rapidamente 400 µL de álcool amílico.
- Aguardar a polimerização em temperatura ambiente.

- Após polimerização, retirar o álcool amílico lavando a superfície com água destilada e retirando o líquido com papel de filtro.

- Gel de empilhamento a 5%:

Água destilada	4,1 mL.
Solução A	1,0 mL.
Solução D	0,75 mL.
Solução C	0,06 mL.
Persulfato de amônio 10%	0,06 mL.
TEMED	0,012 mL.

- Aplicar 1,4 mL de gel de empilhamento, colocando em seguida o pente de Teflon para deposição das amostras, no gel ainda líquido.
- Após polimerização o molde deve ser cuidadosamente removido.
- Preencher a cuba com tampão de corrida.

#### c) Preparo das amostras:

- Diluir as soluções de antígeno em um mesmo volume de tampão de amostra. A mistura é desnaturada por calor a 100°C na presença de excesso de SDS e 2-mercaptoetanol (para clivagem das ligações dissulfeto).
- Colocar em microtubos vedados com parafilme e ferver durante três minutos.

#### d) Preparo dos padrões:

- As proteínas marcadoras (padrões) são desnaturadas e dissociadas de modo idêntico às amostras.
- Ferver durante 60 segundos, conforme orientação do laboratório fabricante.
- O padrão pode ser armazenado em freezer e não é necessário ser novamente fervido quando da reutilização (a não ser que deva ser diluído novamente).

#### e) Aplicação das amostras e padrões:

- Retirar o pente de Teflon do gel polimerizado, lavar os poços com tampão de corrida no topo do gel usando micropipeta. Retirar o excesso.
- Encher os poços do gel com o tampão de corrida usando micropipeta e aplicar cuidadosamente no fundo de cada cavidade, uma amostra. Em uma das cavidades deve ser aplicado o padrão. A capacidade máxima de cada poço é de 80 $\mu$ l, se for usado pente de 10 mm de profundidade, oito mm de largura e um mm de espessura. O volume máximo é calculado através da profundidade do poço X largura do pente X espessura do gel.

f) Migração:

- As cubas do tanque do sistema devem estar preenchidas com tampão de corrida até que os eletrodos estejam totalmente cobertos.
- Conectar os eletrodos na fonte e correr o gel a 30mA, até que o corante indicador (azul de bromofenol) chegue ao fundo do gel.

g) Revelação:

- Após a corrida, retirar os espaçadores, separar as placas de vidro, remover o gel e mergulhá-lo por 30 minutos em solução corante (ou proceder à transferência).
- Retirar da solução corante e mergulhar em solução descorante. Trocar a solução após 15 minutos e então deixar o gel nesta solução por mais 12 horas.

h) Montagem e conservação do gel:

- O gel depois de corado pode ser armazenado em uma solução de glicerol a 20% e selado em plástico transparente. Dessa forma o gel conserva-se bem em geladeira por longo tempo.

**ANEXO 10**

**PROCOLO PARA PROCEDIMENTO DE *WESTERN BLOTTING***, segundo Towbin et al., 1979:

Preparo das soluções:

a) Tampão de transferência

TRIS	3,0 g.
Glicina	14,4 g.
Metanol	200 mL.

Completar com água destilada até o volume de 1000 mililitros.

Filtrar em papel de filtro e armazenar em geladeira.

b) Corante vermelho Ponceau'S

Ponceau'S	0,5 g.
Acido acético glacial	01 mL.

Completar com água destilada até o volume de 100 mililitros.

Filtrar em papel filtro e armazenar em temperatura ambiente.

c) Solução estoque para substrato

3-amino-9-ethylcarbazole	0,4 g.
Dimethylformamida	100 mL.

Armazenar em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

d) Substrato

Acetato de sódio 0,1M, pH 5,2	10 mL.
Sol. estoque aminoethylcarbazole	0,67 mL.

Preparar no momento do uso. Filtrar em papel de filtro Whatman n. 1 e adicionar 10µl de peróxido de hidrogênio a 30%.

Procedimentos da técnica de *Western blotting*:

A técnica de *Western blotting* consiste na transferência eletroforética de proteínas separadas por peso molecular em um gel de SDS-PAGE, para uma membrana de nitrocelulose. O procedimento passa pelas seguintes etapas:

- eletroforese do antígeno em gel de poliacrilamida;
- transferência eletroforética das proteínas para membrana de nitrocelulose;
- coloração das proteínas transferidas em corante Ponceau's,
- corte da membrana em tiras (*blots*), segundo a orientação da transferência.

As etapas subsequentes assemelham-se a um teste ELISA indireto:

- a) Lavagem das tiras em água destilada para remoção do corante, sob lenta agitação por três minutos (agitador de Kline);
- b) Bloqueio com uma solução PBS pH 7,4 com 3% de leite em pó bovino desnatado (Molico®). Incubação por 60 minutos em agitador de Kline;
- c) Lavagem três vezes sob lenta agitação por cinco minutos cada lavagem. Duas vezes com PBS pH 7,4 e uma vez com a solução de bloqueio;
- d) Incubação com os soros de pacientes (diluídos em solução de bloqueio). Incubação "*overnight*", sob lenta agitação em agitador tipo gangorra;
- e) Lavagem seis vezes (cinco vezes com PBS e uma vez com solução de bloqueio) por cinco minutos sob agitação lenta em agitador de Kline;
- f) Incubação com o conjugado anti-IgG humano com peroxidase (Sigma A-0170), diluído em solução de bloqueio. Incubação sob lenta agitação por 120 minutos em agitador tipo gangorra;
- g) Lavagem por seis vezes durante cinco minutos sob agitação. Lavar cinco vezes com PBS pH 7,4 uma vez com tampão de substrato e cromógeno;
- h) Adicionar substrato e cromógeno. Deixar agir até completa reação;
- i) Interromper a reação lavando as tiras com solução PBS pH 7,4.
- j) Deixar as tiras secarem em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

## ANEXO 11

**TABELA 1 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* NO SORO DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO E PARASITOLÓGICO PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.**

Amostra	Procedência	Parasitológico		IFI		ELISA	
		Esfregaço	Cultivo	título		absorbância	
				L.a	L.b	L.a.	L.b.
LPM001	Inferninho	pos	pos	NR	1/320	NR	0,280
LPM002	Inferninho	pos	pos	NR	1/640	NR	0,650
LPM004	Jaciaba	pos	neg	NR	1/80	0,057	0,229
LPM005	Jaciaba	pos	pos	NR	1/40	0,216	0,517
LPM006	Jaciaba	pos	pos	NR	neg	0,122	0,502
LPM007	Jaciaba	pos	neg	NR	1/160	0,349	0,869
LPM008	Jaciaba	pos	pos	NR	1/160	0,081	0,715
LPM009	Jaciaba	pos	pos	NR	1/40	0,075	0,282
LPM012	Postinho	pos	pos	NR	1/160	0,369	0,884
LPM013	Postinho	pos	pos	NR	1/160	0,405	0,558
LPM015	Postinho	pos	pos	NR	1/40	0,231	0,369
LPM016	Postinho	leved.	NR	NR	1/40	0,786	0,347
LPM017	Postinho	pos	pos	NR	1/40	0,162	0,526
LPM018	Postinho	pos	pos	NR	1/40	0,269	0,534
LPM019	Postinho	pos	pos	NR	1/160	0,516	0,834
LPM020	Postinho	pos	pos	NR	1/320	0,283	0,685
LPM021	Ligação	pos	pos	NR	1/160	0,144	0,183
LPM022	Ligação	pos	pos	NR	1/160	0,588	0,459
LPM023	Ligação	pos	pos	NR	1/160	0,250	0,838
LPM024	Ligação	pos	pos	NR	1/80	0,345	0,518
LPM025	Ligação	pos	pos	NR	1/160	0,249	0,807
LPM026	Ligação	pos	pos	1/80	1/320	1,611	0,650
LPM027	Ligação	pos	pos	NR	1/80	0,182	0,509
LPM028	Ligação	pos	pos	1/80	1/160	0,270	0,550
LPM029	Ligação	pos	pos	NR	1/80	0,147	0,669
LPM030	Ligação	pos	pos	NR	1/80	0,293	0,689
LPM031	Ligação	pos	pos	NR	1/160	0,178	0,409
LPM032	Ligação	pos	pos	NR	1/40	0,380	0,726
LPM034	Vitorino	pos	contam.	NR	1/40	0,226	0,375
LPM038	São Francisco	pos	pos	NR	1/40	0,046	0,188
LPM039	S.Francisquinho	pos	pos	NR	1/80	0,216	0,363
LPM040	Jaciaba	neg	neg	NR	1/40	0,032	0,007
LPM041	Jaciaba	pos	pos	NR	1/80	0,262	0,370
LPM043	Vitorino	pos	pos	NR	1/80	0,522	0,645
LPM044	Jaciaba	pos	contam.	NR	neg	0,018	0,020
LPM047	Vitorino	pos	pos	NR	1/80	0,840	0,039
LPM048	Macacos	pos	pos	NR	1/80	0,804	0,045
LPM049	Ivaí Boa Vista	pos	pos	NR	1/80	1,289	0,077
LPM050	Cachoeirinha	pos	pos	1/80	1/40	0,468	0,998
LPM051	Cachoeirinha	pos	pos	1/40	1/40	0,432	1,000

**TABELA 1 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* NO SORO DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO E PARASITOLÓGICO PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA (continuação).**

Amostra	Procedência	Parasitológico		IFI		ELISA	
		Esfregaço	Cultivo	título		absorbância	
				L.a	L.b.	L.a.	L.b.
LPM052	Jaciaba	pos	contam	1/40	1/40	0,640	0,834
LPM053	Jaciaba	pos	pos	1/80	1/40	0,101	0,354
LPM054	Macacos	pos	pos	1/80	1/40	0,913	0,954
LPM055	Macacos	pos	pos	1/80	1/40	0,624	1,439
LPM057	Macacos	pos	neg	neg	1/40	0,351	0,978
LPM058	Moreiras	pos	pos	1/40	1/80	1,058	1,280
LPM061	Jaciaba	pos	pos	NR	1/40	0,343	0,697
LPM062	Jaciaba	pos	pos	NR	1/40	0,511	0,952
LPM063	Jaciaba	pos	pos	NR	1/40	0,373	0,892
LPM064	Ligação	neg	neg	neg	neg	0,172	0,161
LPM065	Ligação	pos	neg	1/40	1/40	0,553	1,040
LPM066	Ligação	neg	neg	NR	neg	0,204	0,237
LPM067	Ligação	neg	pos	NR	neg	0,595	1,230
LPM068	Macacos	pos	pos	1/40	1/40	0,788	1,025
LPM069	Rio Preto	neg	neg	NR	neg	0,219	0,137
LPM070	Ligação	neg	neg	NR	neg	0,317	0,047
LPM071	Jaciaba	neg	neg	NR	neg	0,216	0,043
LPM072	Jaciaba	neg	neg	NR	neg	0,234	0,139
LPM073	Jaciaba	neg	neg	NR	neg	0,268	0,859
LPM074	Jaciaba	pos	pos	neg	neg	0,367	0,647
LPM077	Ligação	pos	pos	1/80	1/80	0,297	0,842
LPM078	Ligação	pos	pos	neg	1/80	0,069	0,150
LPM079	Ligação	pos	pos	1/80	1/80	0,485	1,850
LPM080	Ligação	pos	pos	1/40	1/80	0,078	0,611
LPM081	Turvo	neg	neg	neg	1/80	0,066	0,117
LPM082	Prudentópolis	neg	neg	1/40	1/40	0,479	1,463
LPM083	Prudentópolis	pos	pos	1/80	1/80	0,667	1,953
LPM084	Hospital de Clínicas	pos	pos	NR	NR	NR	NR
LPM085	Pinhalão	pos	neg	1/40	1/40	0,160	0,865
LPM086	Castro	neg	pos	neg	neg	0,146	0,320
LPM087	Castro	neg	pos	neg	neg	0,099	0,193
LPM088	Hospital de Clínicas	neg	pos	1/40	1/80	0,095	0,468
LPM089	Erval Grande	neg	pos	1/40	1/80	1,489	0,628
LPM090	Ligação	neg	neg	1/40	1/80	0,381	0,543

**TABELA 1 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* NO SORO DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO E PARASITOLÓGICO PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA (continuação).**

Amostra	Procedência	Parasitológico		IFI		ELISA	
		Esfregaço	Cultivo	<i>L. a</i>	<i>L. b</i>	título	absorbância
				<i>L. a</i>	<i>L. b</i>	<i>L. a</i>	<i>L. b</i>
LPM091	Postinho	neg	neg	1/40	1/40	0,850	0,500
LPM092	Ivai Boa Vista	neg	neg	1/40	1/40	1,039	0,531
LPM093	Linha S.Franco.	neg	neg	1/40	1/40	1,459	0,792
LPM094	Linha S.Franco.	neg	pos	1/80	1/80	0,598	0,334
LPM095	Ibaiti	neg	pos	neg	1/80	0,381	0,500
LPM096	Cachoeirinha	neg	pos	neg	1/80	0,359	0,357
LPM097	Prudentópolis	neg	neg	neg	neg	0,152	0,078
LPM098	Prudentópolis	neg	neg	neg	neg	0,174	0,080
LPM113	Hospital de Clínicas	neg	neg	1/40	1/40	0,650	1,146
LPM114	Hospital de Clínicas	pos	pos	1/80	1/40	0,550	1,141

**TOTAL= 84**

NR: não realizado; pos: positivo; neg: negativo.



## ANEXO 12

**TABELA 2 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* sp NO SORO DE PACIENTES COM CICATRIZAÇÃO COMPATÍVEL COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA SEM DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.**

Amostra	Procedência	Diagnóstico	IFI		ELISA	
			título		absorbância	
			<i>L.a</i>	<i>L. b</i>	<i>L.a</i>	<i>L.b</i>
LPM010	Postinho	sorol.	NR	1/20	0,257	0,410
LPM011	Postinho	sorol	NR	1/20	0,197	0,400
LPM033	Ligação	sorol.	1/40	1/40	0,046	0,053
LPM046	Jaciaba	sorol.	neg	neg	0,017	0,035
LPM056	Postinho	sorol	NR	1/20	0,393	0,675
LPM059	Cachoeirinha	sorol	NR	neg	0,446	0,734
LPM075	Ligação	sorol.	NR	1/80	0,786	1,498
LPM076	Ligação	sorol.	NR	1/40	0,311	0,181
<b>TOTAL= 08</b>						

**TABELA 3 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* sp NO SORO DE INDIVÍDUOS SEM LEISHMANIOSE CUTÂNEA VIVENDO NAS MESMAS CONDIÇÕES (E RESIDÊNCIA) DAQUELES PORTADORES DA DOENÇA.**

Amostra	Procedência	Diagnóstico	IFI		ELISA	
			título		absorbância	
			<i>L.a.</i>	<i>L.b.</i>	<i>L.a.</i>	<i>L.b.</i>
LPM100	Jaciaba	sorol.famil.	1/40	neg	0,084	0,791
LPM101	Ligação	sorol.famil.	1/40	1/80	0,296	0,218
LPM102	Ligação	sorol.famil.	neg	neg	0,067	0,498
LPM103	Ligação	sorol.famil.	neg	neg	0,040	0,340
LPM104	Jaciaba	sorol.famil.	neg	neg	0,158	0,417
LPM105	Ligação	sorol.famil.	neg	1/40	0,155	0,093
LPM106	S.Francisquinho	sorol.famil.	neg	neg	0,082	0,390
LPM107	Jaciaba	sorol.famil.	neg	neg	0,085	0,117
LPM108	Jaciaba	sorol.famil.	neg	neg	0,067	0,058
LPM109	Ligação	sorol.famil.	neg	neg	0,060	0,370
LPM110	Macacos	sorol.famil.	neg	1/40	0,486	0,671
LPM111	Ligação	sorol.famil.	neg	1/80	0,481	0,639
LPM112	Ligação	sorol.famil.	neg	neg	0,052	0,321
TOTAL = 13						

## ANEXO 13

**TABELA 4 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* NO SORO DE PACIENTES COM OUTRAS ETIOLOGIAS (*Paracoccidioidomycose*)**

Amostra	Paciente	Idade	Procedência	Sexo	IFI		ELISA		
					La	Lb	La	Lb	
					Título	Absorbância			
PCM04	S.R.	40	Prudentópolis	M	neg	neg	0,341	0,081	
PCM05	J.P.	59	Almirante Tamandare	M	1/20	1/20	0,631	0,200	
PCM06	A.G.C.	46	Gamironga	F	Neg	Neg	0,181	0,075	
PCM07	A.A.S.	44	Curitiba	M	Neg	Neg	0,143	0,074	
PCM08	M.S.	58	Mallet	M	Neg	Neg	0,141	0,077	
PCM09	A.J.C	61	Fazenda R.Grande	M	Neg	Neg	0,207	0,092	
PCM10	A.F.S.	53	CIC	M	1/20	Neg	0,791	0,121	
PCM12	A.F.J.	41	Irati	M	Neg	1/20	0,292	0,323	
PCM13	A.M.R.	40	N/c	M	Neg	Neg	0,233	0,081	
PCM14	P.M.G.	55	Candido de Abreu	M	Neg	Neg	0,260	0,082	
PCM15	A.L.F.	49	São José dos Pinhais	M	Neg	1/20	0,282	0,111	
PCM16	L.C.A.	19	S. Ant. do Sudoeste	M	Neg	Neg	0,122	0,080	
PCM17	A.G.S.	45	Curitiba	M	Neg	Neg	0,353	0,135	
PCM18	H.R.E.	43	S. Ant. da Platina	F	Neg	Neg	0,265	0,150	
PCM19	B.P.	61	Mafra	M	Neg	Neg	0,481	0,257	
PCM20	J.W.	39	Paranavaí	F	Neg	Neg	0,101	0,111	
PCM21	A.V.	56	Curitiba	M	1/20	Neg	0,320	0,075	
PCM24	J.R.	21	Marialva	F	Neg	Neg	0,371	0,072	
PCM25	M.A.	49	Agudos do Sul	M	Neg	Neg	0,332	0,063	
PCM27	T.R.	67	Santa Catarina	M	1/40	1/40	0,290	0,144	
PCM28	J.L.	48	Piraquara	M	1/20	1/20	0,401	0,108	
PCM30	A.D.V.	N/c	Adrianópolis	M	Neg	Neg	0,264	0,069	
PCM32	D.R.	N/c	Curitiba	M	Neg	1/20	0,183	0,181	
PCM34	A.G.S.	51	Irati	F	Neg	Neg	0,103	0,072	
PCM36	W.S.	37	Curitiba	M	NR	NR	0,441	0,101	
PCM39	A.J.C.	61	Fazenda R. Grande	M	NR	NR	0,409	0,109	
PCM40	J.T.	N/c	N/c	M	NR	NR	0,462	0,122	
PCM42	A.A.P.	48	N/c	M	NR	NR	0,408	0,280	
PCM43	M.A.P.	N/c	N/c	M	NR	NR	0,356	0,114	
PCM44	R.R.S.	N/c	N/c	M	NR	NR	0,182	0,086	

TOTAL = 30

N/c: Dado não conhecido

**TABELA 5 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* NO SORO DE PACIENTES COM OUTRAS ETIOLOGIAS (Doença de Chagas)**

Amostra	Idade	Sexo	IFI		ELISA	
			Título	Absorbancia	<i>La</i>	<i>Lb</i>
					<i>La</i>	<i>Lb</i>
07	42	M	1/80	1/80	1,160	0,631
12	56	M	1/80	1/20	0,312	0,421
15	48	F	Neg	Neg	0,181	0,500
17	44	M	Neg	Neg	0,051	0,112
10	52	M	1/40	1/80	0,830	1,275
14	60	M	1/40	1/40	0,721	0,632
16	53	M	1/80	1/40	1,154	0,973
18	43	F	1/40	1/40	0,582	0,933
19	40	M	1/20	Neg	0,333	0,301
20	55	F	1/40	1/40	0,691	0,480
TOTAL = 10						

**TABELA 6 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* NO SORO DE PACIENTES COM OUTRAS ETIOLOGIAS (Toxoplasmose)**

Amostra	Idade	Sexo	IFI		ELISA	
			<i>La</i>	<i>Lb</i>	<i>La</i>	<i>Lb</i>
			Título	Absorbância		
5050	N/c	F	Neg	Neg	0,121	0,049
5080	N/c	F	Neg	Neg	0,033	0,012
5104	N/c	F	Neg	Neg	0,047	0,064
652	N/c	F	Neg	Neg	0,035	0,025
5036	N/c	F	Neg	Neg	0,135	0,112
5064	N/c	F	1'/20	1/40	0,771	0,175
5107	N/c	F	Neg	Neg	0,126	0,110
653	N/c	F	Neg	1/20	0,083	0,145
<b>TOTAL = 08</b>						

N/c: dado não conhecido

## ANEXO 14

**TABELA 7 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania braziliensis* PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA.**

AMOSTRA	Peso molecular das proteínas do antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> (Kda)																				
	218,8	199,5	177,8	169,8	158,5	154,9	148,0	135,0	125,9	120,0	112,0	104,7	95,5	85,0	70,8	61,6	56,0	53,7	17,4	16,6	
LPM004			X	X																	
LPM005			X	X												X			X	X	
LPM006			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
LPM007			X	X							X					X		X			
LPM008			X	X															X	X	
LPM009			X	X																	
LPM012	X		X	X				X		X						X					X
LPM013	X		X	X																	
LPM015	X		X	X				X		X											
LPM017			X	X				X		X											
LPM018			X	X				X		X											
LPM019			X	X				X		X									X	X	
LPM020			X	X				X		X											
LPM021	X		X	X				X		X											X
LPM022	X		X	X																	
LPM023			X	X				X		X											
LPM024			X	X				X		X											
LPM025			X	X							X	X				X					
LPM026			X	X							X	X				X					
LPM027			X	X																	
LPM028			X	X																	
LPM029			X	X							X	X				X					
LPM030			X	X							X	X				X					X
LPM031			X	X							X										
LPM032			X	X							X					X					
LPM034			X	X							X					X					
LPM038			X	X																	
LPM039			X	X						X	X										
LPM041			X	X																	
LPM043			X	X						X	X					X					
LPM047			X	X						X	X					X					
LPM048										X						X					
LPM049			X	X						X	X					X			X	X	
LPM051			X	X						X	X										
LPM052			X																		
LPM053			X	X																	
LPM054			X	X												X					

**TABELA 7 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania braziliensis* PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA (continuação).**

AMOSTRA	Peso molecular das proteínas do antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> (Kda)																			
	218,8	199,5	177,8	169,8	158,5	154,9	148,0	135,0	125,9	120,0	112,0	104,7	95,5	85,0	70,8	61,6	56,0	53,7	17,4	16,6
LPM055			x	x						x	x						x			
LPM057			x	x							x						x			
LPM058			x	x						x	x									
LPM061			x	x																
LPM062			x	x																
LPM065			x	x							x									
LPM068			x	x																
LPM074	x		x	x							x									
LPM077			x	x																
LPM078			x	x																
LPM079			x	x	x						x									
LPM080			x	x															x	x
LPM082			x	x	x	x	x				x	x					x	x		
LPM083			x	x	x						x	x							x	x
LPM085			x	x				x				x								
LPM086			x	x																
LPM087			x	x																
LPM088			x	x																
LPM089			x	x																
LPM094			x	x																
LPM095																				
LPM096	x			x	x															
LPM114			x	x				x			x									
TOTAL=60	5	2	58	57	6	2	2	12	1	18	23	8	1	1	1	18	1	2	6	9





## ANEXO 16

**TABELA 9 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania braziliensis* PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING NO SORO DE PESSOAS SEM LEISHMANIOSE CUTÂNEA DE ÁREA INDENE PARA A DOENÇA.**

AMOSTRA	Peso molecular das proteínas do antígeno de <i>Leishmania amazonensis</i> (Kda)			
	194,9	184,5	173,8	162,2
LPMn01				
LPMn02			x	
LPMn03				
LPMn04			x	
LPMn05	x			
LPMn06		x		
LPMn07			x	x
LPMn08				
LPMn09				
LPMn10			x	
LPMn11		x	x	
LPMn12				
TOTAL = 13	1	2	5	1

## ANEXO 17

**TABELA 10 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania amazonensis* PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING NO SORO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTANEA**

AMOSTRA	Peso molecular das proteínas do antígeno de <i>Leishmania amazonensis</i> (Kda)																										
	173,7	154,9	151,3	144,5	141,2	138	123	114,8	112	109,6	104,7	100	89,1	83,1	79,4	75,8	74,1	69,1	63	46,7	40,7	33,9	33,1	30,9	29,5	23,9	
LPM004														x	x												
LPM005	x			x		x		x															x	x	x	x	
LPM006		x	x	x	x	x	x	x	x	x																	
LPM007									x	x	x		x	x	x	x	x				x		x	x	x	x	
LPM008	x	x	x	x					x	x											x						
LPM009	x	x							x	x											x	x					
LPM012	x								x	x	x		x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	
LPM013	x	x	x	x					x	x			x	x	x	x	x						x	x	x	x	
LPM015	x									x	x			x	x								x	x	x	x	
LPM017	x	x	x							x																	
LPM018	x	x	x	x	x	x					x			x	x	x	x						x	x	x	x	
LPM019	x	x			x							x		x	x	x	x				x		x	x	x	x	
LPM020												x		x	x						x		x	x	x	x	
LPM021														x	x						x						
LPM022	x		x	x	x				x	x				x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	
LPM023	x		x		x	x							x	x	x	x	x				x		x	x	x	x	
LPM024	x		x	x	x	x			x	x			x	x	x	x	x	x			x		x	x	x	x	
LPM025	x	x	x	x	x	x								x	x	x	x						x	x	x	x	
LPM026	x			x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x				x		x	x	x	x	
LPM027	x		x	x	x	x								x	x	x	x				x		x	x	x	x	
LPM028														x	x	x	x						x	x	x	x	
LPM029			x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x				x		x	x	x	x	
LPM030	x		x	x	x	x								x	x	x	x				x		x	x	x	x	
LPM031	x		x	x	x	x	x		x	x	x		x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	
LPM032			x	x	x	x						x		x	x	x	x				x						
LPM034	x			x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x						x	x	x	x	
LPM038				x	x	x										x	x										
LPM039	x			x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x						x	x	x	x	
LPM041	x			x	x	x			x	x			x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	
LPM043	x			x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	
LPM047		x	x								x			x	x	x	x					x		x	x	x	
LPM048			x		x	x								x	x	x	x					x		x	x	x	
LPM049	x	x	x	x		x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	

**TABELA 10 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania amazonensis* PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING NO SORO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTANEA (continuação)**

AMOSTRA	Peso molecular das proteínas do antígeno de <i>Leishmania amazonensis</i> (Kda)																										
	173,7	154,9	151,3	144,5	141,2	138	123	114,8	112	109,6	104,7	100	89,1	83,1	79,4	75,8	74,1	69,1	63	46,7	40,7	33,9	33,1	30,9	29,5	23,9	
LPM051	x				x	x										x	x			x							
LPM052	x	x	x					x	x	x					x	x	x	x			x		x	x	x	x	
LPM053					x										x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM054	x		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x			x		x	x	x	x	
LPM055	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x			x		x	x	x	x	x
LPM057									x	x		x			x	x	x	x									
LPM058	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x			x		x	x	x	x	
LPM061	x		x						x	x					x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM062															x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM065		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x
LPM068		x													x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM074															x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM077						x			x	x							x	x					x	x	x	x	
LPM078																											
LPM079									x	x					x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM080			x												x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM082			x									x			x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM083	x		x												x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM085					x	x					x		x		x	x	x	x					x	x	x	x	x
LPM086			x	x	x	x			x	x							x	x					x	x	x	x	
LPM087	x		x												x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM088			x	x	x	x	x	x							x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM089	x		x	x	x	x		x	x	x					x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM094															x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM095									x	x					x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM096	x		x	x	x			x							x	x	x	x					x	x	x	x	
LPM114											x																x
TOTAL=60	32	13	31	28	30	29	12	15	28	30	14	8	15	50	50	49	49	6	3	24	4	48	48	48	48	3	

## ANEXO 18

**TABELA 11 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania amazonensis* PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING NO SORO DE PESSOAS SEM LEISHMANIOSE CUTANEA EM ÁREA DE TRANSMISSÃO PARA A DOENÇA.**

AMOSTRA	Peso molecular das proteínas do antígeno de <i>Leishmania amazonensis</i> (Kda)																				
	173,7	154,9	151,3	144,5	141,2	138	123	114,8	112	109,6	104,7	100	83,1	79,4	75,8	74,1	33,9	33,1	31	29,5	
LPM100		x	x	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x	x	x	x	x
LPM101									x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x
LPM102								x													
LPM103											x										
LPM104													x	x	x	x	x	x	x	x	x
LPM105	x								x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x
LPM106													x	x	x	x	x	x	x	x	x
LPM107													x	x	x	x					
LPM108													x	x	x	x					
LPM109									x	x			x	x	x	x					
LPM110				x	x		x		x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x
LPM111	x		x	x	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
LPM112									x	x											
TOTAL 13	2	1	2	3	3	1	3	2	6	6	1	1	10	10	10	10	7	7	7	7	7

## ANEXO 19

**TABELA 12 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania amazonensis* PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING NO SORO DE PESSOAS SEM LEISHMANIOSE CUTANEA DE ÁREA INDENE PARA A DOENÇA**

Peso molecular das proteínas do antígeno de <i>Leishmania amazonensis</i> (Kda)									
AMOSTRA	173,7	162,2	128,8	91,2	81,2	75,8	74,1	33,9	30,9
LPMn01									
LPMn02									
LPMn03	x	x	x	x	x	x	x		
LPMn04		x							
LPMn05							x	x	x
LPMn06							x		
LPMn07									
LPMn08		x				x	x	x	x
LPMn09		x		x		x	x	x	x
LPMn10						x	x	x	x
LPMn11				x		x	x	x	x
LPMn12							x	x	x
TOTAL = 13	1	4	1	3	1	5	8	6	6